

***Alginate und Carrageenane –
Eigenschaften, Gewinnung und
Anwendungen in Schule und Hochschule***

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

**dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von**

**Anke Marburger
aus Kreuztal**

Marburg/Lahn 2003

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 18.09.2003 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Hartwig Perst

Zweitgutachter: Prof. Dr. Armin Berndt

Zusätzlicher Gutachter: Dr. Ernst Gerstner

Tag der mündlichen Prüfung am 21.10.2003

Inhaltsverzeichnis

A	EINLEITUNG	1
B	THEORETISCHER TEIL	4
	1 Einführung: Was sind Alginat und Carrageenane?	4
	2 Alginat	6
	2.1 Historische Aspekte und heutige Bedeutung	6
	2.2 Chemischer Aufbau und Struktur	7
	2.2.1 Theoretischer Hintergrund	7
	2.2.2 Alginat als typische Polysaccharid-Vertreter	10
	2.3 Charakteristische Eigenschaften	12
	2.3.1 Lösungsverhalten	12
	2.3.1.1 Allgemeine Aspekte	12
	2.3.1.2 Herstellung von Natriumalginat-Solen	12
	2.3.1.3 Kolloid-Charakter von Natriumalginat-Lösungen	14
	2.3.2 Gelbildung	19
	2.3.2.1 Allgemeine Charakteristika von Solen und Gelen	19
	2.3.2.2 Gelbildung bei Alginaten	20
	2.3.3 Stabilisierung von Emulsionen und Suspensionen	24
	2.3.3.1 Hintergrundinformationen	24
	2.3.3.2 Alginat als Emulsions- und Suspensionsstabilisatoren	27
	2.4 Gewinnung aus Braunalgen	29
	2.4.1 Rohstoffquellen und Ernte	29
	2.4.2 Großtechnisches Produktionsverfahren	32
	2.4.3 Labormethoden zur Isolierung von Alginat	38
	2.4.3.1 Gewinnung von Alginsäure aus <i>Laminaria</i> -Spezies	38
	2.4.3.2 Gewinnung von Alginsäure aus <i>Fucus vesiculosus</i>	42
	2.4.3.3 Vereinfachte Isolierung von Rohalginat aus Braunalgen	50
	2.5 Organische Derivate	53
	2.5.1 Chemischer Aufbau und Darstellung	53
	2.5.2 Charakteristische Eigenschaften	55
	2.6 Ausgewählte Anwendungsmöglichkeiten	56
	2.6.1 Übersicht	56
	2.6.2 Lebensmittelindustrie	58
	2.6.2.1 Alginat	58
	2.6.2.2 Propylenglykolalginat	64
	2.6.3 Biotechnologie	69
	2.6.3.1 Allgemeine Aspekte	69
	2.6.3.2 Matrixeinschluss von Zellen in Calciumalginat-Gel	72
	2.6.3.3 Ethanol-Produktion mit immobilisierter Hefe	77
	2.6.3.5 Schaumwein-Herstellung mit Calciumalginat-Hefe-Immobilisaten	97
	2.6.3.6 Immobilisierung von β -Galactosidase in Calciumalginat und Einsatz für die enzymatische Lactose-Spaltung	102

2.6.4	Medizin und Pharmazie	118
2.6.4.1	Überblick	118
2.6.4.2	Wundauflagen aus Calciumalginat-Fasern	119
2.6.4.3	Dentalabdruckmassen auf Alginat-Basis	124
2.6.4.4	Alginat- und alginsäurehaltige Arzneimittel gegen Sodbrennen	131
2.6.4.5	Dekorporierung von radioaktivem Strontium	141
2.6.5	Potentielle neue Einsatzzwecke	146
2.6.5.1	Quantitative Bestimmung von Erdalkalimetall-Kationen mit Alginsäure-Kationenaustauschern	146
2.6.5.2	Versuche zur Racemat-Spaltung mit Alginsäure und Calciumalginat	172
2.6.5.3	Versuche zur Trennung und Hydrolyse von Zuckern mit Alginsäure und Calciumalginat im Säulenbetrieb	177
3	Carrageenane	191
3.1	Historische Aspekte und heutige Bedeutung	191
3.2	Chemischer Aufbau und Struktur	192
3.2.1	Theoretischer Hintergrund	192
3.2.2	Carrageenane als typische Polysaccharid-Vertreter	195
3.3	Charakteristische Eigenschaften	196
3.3.1	Lösungsverhalten	196
3.3.1.1	Allgemeine Aspekte	196
3.3.1.2	Herstellung von Carrageenan-Lösungen	197
3.3.1.3	Kolloid-Charakter von Carrageenan-Lösungen	198
3.3.2	Gelbildung	199
3.3.2.1	Theoretischer Hintergrund	199
3.3.2.2	Experimentelle Umsetzung	204
3.3.3	Stabilisierung von Emulsionen und Suspensionen	206
3.3.3.1	Theoretischer Hintergrund	206
3.3.3.2	Experimentelle Umsetzung	206
3.4	Gewinnung aus Rotalgen	207
3.4.1	Rohstoffquellen und Ernte	207
3.4.2	Großtechnisches Produktionsverfahren	210
3.4.3	Processed Eucheuma Seaweed (PES)	217
3.4.4	Labormethoden zur Isolierung von Carrageenan	218
3.5	Ausgewählte Anwendungsmöglichkeiten	222
3.5.1	Übersicht	222
3.5.2	Lebensmittelindustrie	223
3.5.2.1	Lebensmittelrechtliche und toxikologische Beurteilung	223
3.5.2.2	Nutzung	225
3.5.3	Potentielle neue Einsatzzwecke	248
3.5.3.1	Versuche zur Racemat-Spaltung mit Carrageenanen	248

4	Chemiedidaktische Relevanz der vorgestellten Inhalte	252
4.1	Algenpolysaccharide im Chemieunterricht	252
4.1.1	Alginate	252
4.1.2	Carrageenane	260
4.1.3	Abschließende Einschätzung	263
4.2	Alginate und Carrageenane im universitären Bereich	265
C	SCHLUSSBETRACHTUNG	267
D	EXPERIMENTELLER TEIL	271
1	Allgemeine Hinweise	271
2	Versuchsvorschriften	271
2.1	Alginate	271
2.1.1	Chemischer Aufbau und Struktur	271
2.1.2	Charakteristische Eigenschaften	273
2.1.3	Gewinnung aus Braunalgen	278
2.1.4	Ausgewählte Anwendungsmöglichkeiten	288
2.1.4.1	Lebensmittelindustrie	288
2.1.4.2	Biotechnologie	295
2.1.4.3	Medizin und Pharmazie	347
2.1.4.4	Potentielle neue Einsatzzwecke	355
2.2	Carrageenane	381
2.2.1	Chemischer Aufbau und Struktur	381
2.2.2	Charakteristische Eigenschaften	382
2.2.3	Gewinnung aus Rotalgen	388
2.2.4	Ausgewählte Anwendungsmöglichkeiten	392
2.2.4.1	Lebensmittelindustrie	392
3	Demonstrationen und Modelle	407
3.1	Alginate	407
3.1.1	Einführung	407
3.1.2	Charakteristische Eigenschaften	407
3.1.3	Ausgewählte Anwendungsmöglichkeiten	408
3.2	Carrageenane	409
3.2.1	Charakteristische Eigenschaften	409
E	LITERATURVERZEICHNIS	411
F	FIRMENVERZEICHNIS	426
G	ANHANG	431
1	t-Tabelle	431
2	Danksagungen	432

A EINLEITUNG

Alginat und Carrageenane sind Polysaccharid-Derivate, die als Strukturkomponenten in den Zellwänden der Braunalgen bzw. bestimmter Rotalgen-Gattungen vorkommen. Seit der Entdeckung, dass die genannten Algeninhaltsstoffe über besondere Sol- und Gelbildungseigenschaften verfügen, hat sich für diese ein großes Spektrum von Anwendungsmöglichkeiten in den unterschiedlichsten Bereichen ergeben.

Obwohl Alginat und Carrageenane bereits seit mehreren Jahrzehnten technisch genutzt werden und inzwischen eine nicht zu unterschätzende wirtschaftliche Bedeutung erlangt haben, ist außerhalb von Expertenkreisen nur wenig über die Struktur, das chemische Verhalten und die Verwendungszwecke der beiden Algenpolysaccharide bekannt. Folglich sind wir uns in der Regel nicht der Tatsache bewusst, dass man auch im Alltagsleben häufig mit diesen Stoffen konfrontiert wird.

In der vorliegenden Arbeit soll daher eine detaillierte Auseinandersetzung mit den charakteristischen Eigenschaften, der Gewinnung und ausgewählten Einsatzmöglichkeiten der Alginat und Carrageenane stattfinden.

In diesem Zusammenhang diskutierte theoretische Aspekte werden dabei an geeigneter Stelle durch Experimente veranschaulicht, die durch eigene Untersuchungen in Anlehnung an technische Verfahren entwickelt wurden oder Abwandlungen bereits in der Literatur dokumentierter Versuche darstellen. Die Experimente sind so konzipiert, dass sie aufgrund ihres relativ geringen Material- und Zeitbedarfes sowie ihrer einfachen Durchführbarkeit für Lehrzwecke, z. B. im Schul- oder Praktikumsbetrieb, eingesetzt werden können.

Ein weiteres Ziel der Arbeit besteht darin, unter Ausnutzung der besonderen Eigenschaften von Alginaten und Carrageenanen potentielle neue Anwendungsmöglichkeiten für diese Algenpolysaccharide zu finden.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in einen Theoretischen und einen Experimentellen Teil (Teile B und D):

Im einführenden Kapitel des Theoretischen Teils (B) werden die beiden Algenpolysaccharide zunächst grundlegend bezüglich ihrer chemischen Zusammensetzung, ihres Vorkommens und ihrer Funktion in den Herkunftspflanzen charakterisiert.

Die sich anschließenden Einzelkapitel über Alginat (Kapitel 2) und Carrageenane (Kapitel 3) sind strukturell analog aufgebaut: Ausgehend von einem historischen Überblick (2.1 bzw. 3.1) erfolgt zunächst jeweils eine Detailbetrachtung des chemischen Aufbaus und der Struktur der Polysaccharid-Derivate (2.2 bzw. 3.2). Im Anschluss daran werden deren wichtigste charakteristische Eigenschaften näher beleuchtet (2.3 bzw. 3.3). Dazu gehören vor allem das Sol- und Gelbildungsverhalten sowie die emulsions- und suspensionsstabilisierenden Fähigkeiten von Alginaten und Carrageenanen.

Die Gewinnung von Alginaten und Carrageenanen basiert auf den zuvor erwähnten Sol- und Gelbildungseigenschaften der Braun- bzw. Rotalgenpolysaccharide und wird daher erst in den entsprechenden Folgekapiteln (2.4 bzw. 3.4) diskutiert: Nach einer Auseinandersetzung mit dem Vorkommen und den Erntemethoden der für die großtechnische Alginate- bzw. Carrageenan-Gewinnung eingesetzten Algen werden zunächst wichtige industrielle Verfahren zur Produktion der beiden Polysaccharid-Derivate diskutiert. Im Anschluss daran werden im Rahmen der Arbeit entwickelte Laborverfahren vorgestellt, mit denen sich Alginsäure und Carrageenane in Reinform aus Braun- bzw. Rotalgen extrahieren lassen. Schließlich erfolgt die Diskussion von vereinfachten, schulgeeigneten Versuchen zur Isolierung der Rohpolysaccharide und Überprüfung ihrer Eigenschaften. Diese wurden ebenfalls in der vorliegenden Untersuchung konzipiert.

In Kapitel 2.5 des Theoretischen Teils erfolgt die Auseinandersetzung mit wichtigen organischen Derivaten der Alginate. Dabei werden deren chemischer Aufbau, Darstellung und Eigenschaften näher beleuchtet. Im Carrageenan-Teil fehlt das entsprechende Kapitel, da die Derivatisierung dieses Rotalgenpolysaccharids in der Literatur nicht dokumentiert ist.

Einen weiteren Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bilden die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten der Alginate und Carrageenane (Kapitel 2.6 bzw. 3.5). Hier macht man sich ebenfalls viele der vorstehend angesprochenen Eigenschaften der Polysaccharid-Derivate zunutze:

Zunächst sollen in der Arbeit bereits existierende Alltagsanwendungen der Algenpolysaccharide aufgegriffen und theoretisch bezüglich ihrer chemischen und prozesstechnischen Hintergründe untersucht werden. Während Alginate auf sehr vielfältige Weise in Lebensmittelindustrie (2.6.2), Biotechnologie (2.6.3) und im medizinisch-pharmazeutischen Bereich (2.6.4) Verwendung finden, ist der Einsatz von Carrageenanen weitgehend auf den Nahrungsmittelsektor (3.5.2) beschränkt. Zur Veranschaulichung der typischen alltagsrelevanten Nutzungsmöglichkeiten der beiden Algenpolysaccharide werden im Rahmen der Arbeit jeweils einfache, aber aussagekräftige Experimente entwickelt, die sich für die schulische und teilweise auch für die universitäre Chemieausbildung eignen.

In den Kapiteln 2.6.5 bzw. 3.5.3 findet eine Auseinandersetzung mit potentiellen neuen Einsatzmöglichkeiten der Polysaccharid-Derivate aus Braun- bzw. Rotalgen im Bereich der anorganischen, organischen und analytischen Chemie statt:

In diesem Zusammenhang werden Alginsäure-Gele auf ihre Verwendbarkeit als Kationenaustauscher für acidimetrische Erdalkalimetall-Bestimmungen untersucht (Kapitel 2.6.5.1). Des Weiteren wird über die Entwicklung von Verfahren zur Herstellung und Handhabung von Trägermaterialien aus Alginsäure- und Calciumalginat berichtet, die auf ihre Eignung für die Racemat-Spaltung (Kapitel 2.6.5.2) sowie für die säulenchromatographische Trennung von Zucker-Gemischen und die Disaccharid-Hydrolyse (Kapitel 2.6.5.3) überprüft werden sollen.

Im Falle der Carrageenane erfolgt ebenfalls die Beschäftigung mit Herstellungs- und Stabilisierungsverfahren von Säulenfüllungen aus diesem Rotalgenpolysaccharid. Diese werden dann in Versuchsreihen auf Ihre Einsatzmöglichkeit für die Enantiomeren-Trennung getestet (Kapitel 3.5.3.1).

Der Theoretische Teil schließt mit Kapitel 4, in dem eine Auseinandersetzung mit der Frage erfolgt, welche Relevanz die dargelegten Inhalte für den schulischen und universitären Bereich haben. Die für den Chemieunterricht geeigneten Themengebiete der vorliegenden Arbeit wurden bereits in großen Teilen in fachdidaktischen Zeitschriften publiziert (Marburger/Gerstner 2000 a, b; Marburger 2002 a, b) bzw. zur Veröffentlichung angenommen (Marburger 2003 b, c, d). Basierend auf hier erhaltenen Experimentalbefunden wurden außerdem ausführliche Materialien für Lehrerfortbildungskurse über Alginat und Carrageenane erarbeitet (Marburger/Rickelt/Schween 2001 a, b, c; Marburger 2003 a).

Detaillierte Beschreibungen der Versuche zu den Eigenschaften, der Gewinnung sowie den bereits existenten bzw. möglichen neuen Einsatzzwecken von Alginaten und Carrageenanen finden sich im Experimentellen Teil (D). Des Weiteren werden hier Demonstrationen und Modelle vorgestellt, mit denen sich strukturelle und eigenschaftsbezogene Aspekte der Algenpolysaccharid-Chemie illustrieren lassen.

B THEORETISCHER TEIL

1 Einführung: Was sind Alginat und Carrageenane?

Chemisch gesehen lassen sich Alginat und Carrageenane in erster Näherung als Polysaccharid-Derivate charakterisieren. Während es sich bei Alginaten um Salze von Poluronsäuren handelt, stellen Carrageenane Makromoleküle aus verschiedenen Galactose-Derivaten dar.

Trotz ihres unterschiedlichen chemischen Aufbaus weisen Alginat und Carrageenane bezüglich ihrer Herkunft als Gemeinsamkeit auf, dass beide Polysaccharid-Derivate als Strukturkomponenten in den Zellwänden bestimmter Algen vorkommen. Die folgende Übersicht verdeutlicht diesen Zusammenhang:

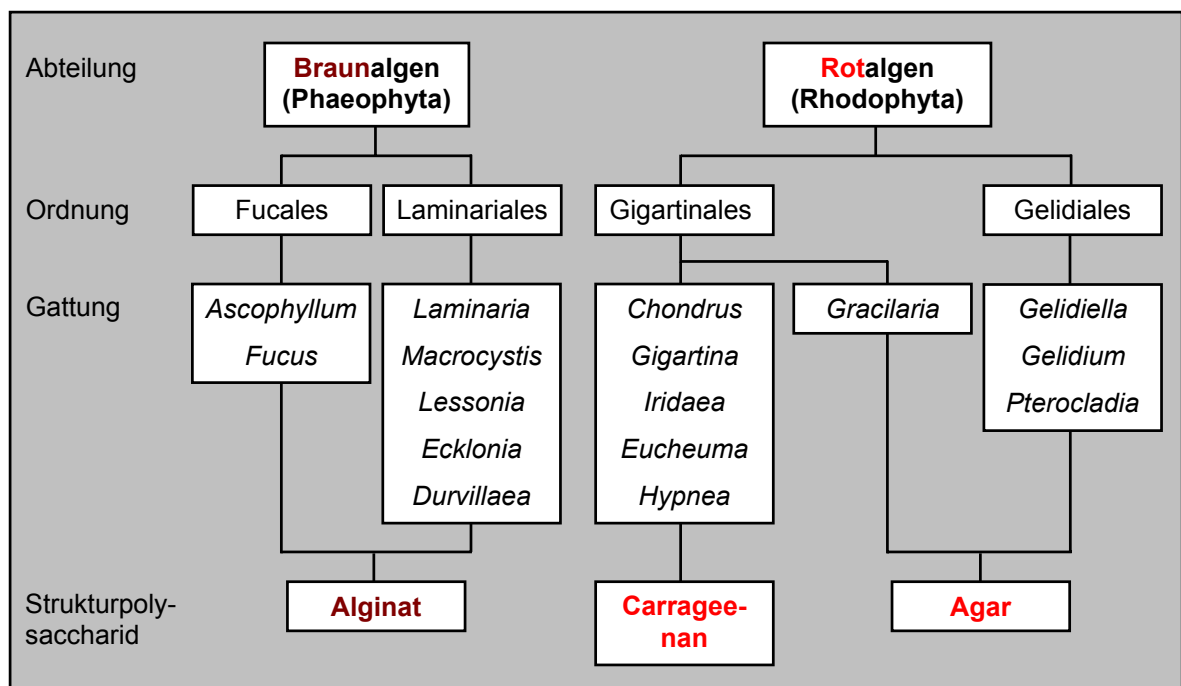


Abb. 1: Übersicht über marine Makroalgen, deren Strukturpolysaccharide industriell genutzt werden (Voragen/Pilnik 1994, S. 35; verändert nach Armisen 1997, S. 3; Firma Pronova Biopolymer, S. 3; Lüning 1985, S. 290 – 292, 342 – 344).

Als Ausgangsmaterial für die industrielle Gewinnung von Alginat finden hauptsächlich die in Abbildung 1 aufgeführten marinen Makroalgen der Ordnungen Laminariales und Fucales Verwendung (Firma Pronova Biopolymer, S. 3; Jensen 1995, S. 86; Voragen/Pilnik 1994, S. 35).

Die Zellwände dieser Algen enthalten als strukturgebende Hauptbestandteile die Polysaccharide Cellulose und Alginat: Cellulose bildet den fibrillären Anteil der Zellwand, welcher deren Festigkeit sicherstellt. Die Cellulose-Fibrillen sind in eine amorphe, schleimartige Matrix eingebettet, die überwiegend aus in Wasser kolloidal gelösten Alginaten besteht.

Eine zusätzliche Verstärkung der fibrillären Zellwandfraktion erfolgt durch unlösliche Alginat-Gele (van den Hoek/Jahns/Mann 1993, S. 136).

Durch ihre Fähigkeit, viskose Sole und Gele zu bilden, verleihen Alginat marinen Braunalgen gleichzeitig Flexibilität und Festigkeit (Firma Pronova Biopolymer, S. 2). Beide Eigenschaften sind erforderlich, damit diese Wasserpflanzen den in ihrem Lebensraum auftretenden extremen mechanischen Belastungen durch Meeresströmungen und Wellenbewegungen standhalten können (Jensen 1995, S. 85). Die besondere Beschaffenheit von Braunalgen wird in Demonstration 1 veranschaulicht (vgl. Experimenteller Teil).

Im Gegensatz zu Alginat stellt Carrageenan ein Strukturelement der Zellwände bestimmter Rotalgen dar. Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, werden als Rohstoffquellen für die industrielle Gewinnung dieses Polysaccharid-Derivats vor allem großwüchsige Meeresalgen der Gattungen *Chondrus*, *Gigartina*, *Iridaea*, *Euचेuma* und *Hypnea* genutzt (Lüning 1985, S. 283 f., 292; Voragen/Pilnik 1994, S. 35).

Bei Rotalgen unterscheidet man ebenfalls eine fibrilläre und eine amorphe Zellwandfraktion: Den festen inneren Teil der Zellwand bildet zumeist ein filzartiges Geflecht aus Cellulose-Mikrofibrillen. Die schleimige Matrix, welche diese Fibrillen umgibt, besteht jedoch im Unterschied zu den Braunalgen nicht aus Alginat, sondern enthält Galactane, d. h. Makromoleküle aus Galactose und deren Derivaten (van den Hoek/Jahns/Mann 1993, S. 42). Im Hinblick auf den Galactan-Typ, der die amorphe Zellwandfraktion bildet, unterscheidet man zwei große Gruppen von Rotalgen (Lüning 1985, S. 290 – 292): Während bei den sogenannten Carrageenophyten die schleimartige Grundsubstanz Carrageenan enthält, setzt sie sich bei den Agarophyten aus einem komplex aufgebauten Heteropolysaccharid namens Agar zusammen, auf das im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

Die Funktion des Carrageenans in Carrageenophyten entspricht weitgehend derjenigen des Alginats in Braunalgen: Aufgrund seiner Fähigkeit, in Wasser viskose Sole und Gele zu bilden, verleiht dieses Polysaccharid „[...] Rotalgen ihre charakteristische flexible, schlüpfrige Beschaffenheit [...]“ (Raven/Evert/Curtis 1988, S. 295), welche eine Grundvoraussetzung für deren Existenz in marinen Lebensräumen darstellt.

2 Alginat

2.1 Historische Aspekte und heutige Bedeutung

Die Entdeckung von Alginat wird dem britischen Chemiker und Pharmazeuten Stanford zugeschrieben (Cotrell/Kovacs 1980, S. 2-2; Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 211). Dem Wissenschaftler gelang 1880 erstmals die Gewinnung von Rohalginssäure aus Braunalgen, und er ließ sich die dafür entwickelte Methode ein Jahr später patentieren (Stanford 1881; zitiert in Moe et al. 1995, S. 245).

Stanford prägte auch den Namen „algin“ für die löslichen Stoffe in einem wässrigen Sodaextrakt aus Braunalgen sowie die Bezeichnung „alginic acid“ für das Präzipitat, das man daraus durch Zugabe von Säure erhält (Voragen/Pilnik 1994, S. 34). Er nahm zunächst an, dass es sich bei Alginsäure um eine Substanz der Formel $C_{76}H_{76}O_{22}(NH_2)_2$ handle. Durch Verbesserung der Isolierungsverfahren konnte jedoch gezeigt werden, dass der von dem Briten gefundene Stickstoff lediglich eine Verunreinigung des Algenpolysaccharids darstellte (Furia 1972, S. 306).

In den Vereinigten Staaten wurde von Krefting (1896; zitiert in Sime 1990, S. 53) zwar schon im Jahre 1896 ein Patent für die Gewinnung von Alginat in Reinform angemeldet, aber die industrielle Produktion des Algenpolysaccharids begann dort erst in den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts. Als Meilenstein ist in diesem Zusammenhang die Gründung der kalifornischen Kelco Company im Jahre 1929 zu nennen (Cotrell/Kovacs 1980, S. 2-2; Sime 1990, S. 53).

Heutzutage werden weltweit etwa 40.000 Tonnen Alginat pro Jahr gewonnen (Marinalg 2003). Zu den Hauptproduktionsländern zählen die USA, Großbritannien, Norwegen, Kanada, Frankreich, Japan und China (Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 211; Marinalg 2003). Als Grund für die Expansion der Alginat-Industrie wird die Entdeckung einer Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten des Algenpolysaccharids in verschiedenartigen Bereichen gesehen (Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 211).

2.2 Chemischer Aufbau und Struktur

2.2.1 Theoretischer Hintergrund

Wie bereits in Teil B, Kapitel 1 angedeutet, lassen sich Alginate ganz allgemein als Salze von Polyuronsäuren charakterisieren. Unter Uronsäuren versteht man diejenigen Zuckersäuren, die formal aus Aldosen mit mindestens vier C-Atomen durch Oxidation der endständigen CH_2OH -Gruppe zur Carboxyl-Funktion entstehen (Falbe/Regitz 1995 f, S. 4844).

Die monomeren Bausteine des Alginats sind β -D-Mannuronat und α -L-Guluronat, d. h. die von β -D-Mannose und α -L-Gulose ableitbaren Uronate (vgl. Abbildung 2):

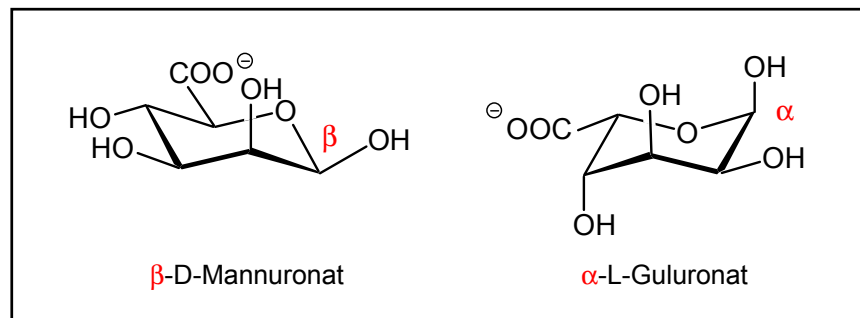


Abb. 2: Monomere Bausteine des Alginats.

Als Gegenionen finden sich in Braunalgen hauptsächlich Alkali- und Erdalkalimetall-Kationen, wie z. B. Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} und Ba^{2+} (Moe et al. 1995, S. 246; Smidsrød/Draget 1996, S. 6).

Die β -D-Mannuronat- und α -L-Guluronat-Reste sind im Alginat linear über 1,4-glykosidische Bindungen verknüpft. Der Polymerisationsgrad liegt durchschnittlich zwischen 100 und 3.000. Dies entspricht Molekülmassen im Bereich von etwa 20.000 bis 600.000 u (Onsøyen 1997, S. 24).

Wie in Abbildung 3 deutlich wird, bilden die β -D-Mannuronat- und α -L-Guluronat-Reste im Alginat Sequenzen mit Homopolymer- und alternierender Struktur (vgl. z. B. Moe et al. 1995, S. 247 ff.).

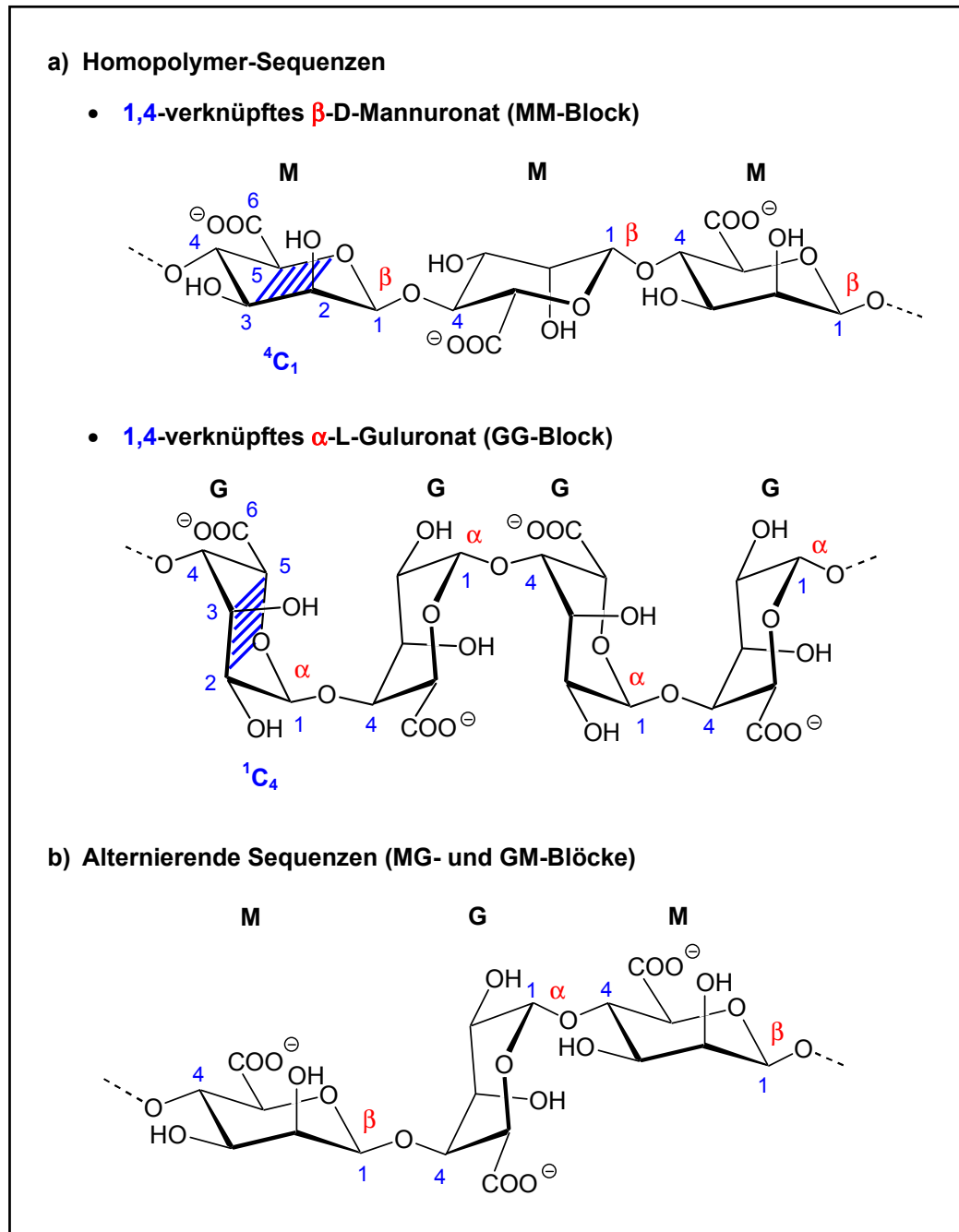


Abb. 3: Alginat-Blocktypen (Onsøyen 1997, S. 24; verändert).

Bei den Homopolymer-Sequenzen unterscheidet man zwei verschiedene Kategorien: Während die sogenannten „MM-Blöcke“ aus β -1,4-glykosidisch verknüpften D-Mannuronat-Resten bestehen, liegen in den „GG-Blöcken“ L-Guluronat-Reste mit α -1,4-glykosidischer Bindung vor (vgl. Abbildung 3 a)).

Im dritten Alginat-Blocktyp, der Sequenz mit alternierender Struktur, sind D-Mannuronat- und L-Guluronat-Reste abwechselnd β -1,4- und α -1,4-glykosidisch miteinander verbunden (vgl. Abbildung 3 b)).

Folglich existieren im Alginat alle vier möglichen Arten von glykosidischen Bindungen: di-äquatorial (MM), diaxial (GG), äquatorial-axial (MG) sowie axial-äquatorial (GM) (Moe et al. 1995, S. 258).

Für das Verständnis der Polymereigenschaften von Alginaten ist die Kenntnis der Ringkonformationen der monomeren Bausteine von Relevanz. Durch Röntgenstrukturanalyse mannuronat- und guluronatreicher Alginat-Proben stellten Atkins/Mackie/Smolko (1970; zitiert in Moe et al. 1995, S. 257) fest, dass die β -D-Mannuronat-Reste in MM-Blöcken in der 4C_1 -Konformation¹ vorliegen. Dahingegen nehmen die α -L-Guluronat-Reste in den GG-Sequenzen 1C_4 -Konformation² ein.

Die durch die 1C_4 -Konformation des α -L-Guluronats bedingte diaxiale Verknüpfung der Monomer-Bausteine in GG-Sequenzen bewirkt eine starke Hinderung der Rotationsmöglichkeit um glykosidische Bindungen (Moe et al. 1995, S. 258; Rees/Welsh 1977, S. 233). Aufgrund dieser Tatsache weisen Polyguluronat-Ketten eine deutlich größere Steifheit auf als Polymannuronat-Blöcke.

Durch Viskositätsmessungen und statistisch-mechanische Berechnungen zeigten Smidsrød/Glover/Whittington (1973; zitiert in Moe et al. 1995, S. 258), dass die α -L-Guluronat-Reste auch in alternierenden MG- und GM-Sequenzen in der 1C_4 -Konformation vorliegen. Diese Annahme wurde von Grasdalen/Larsen/Smidsrød (1977; zitiert in Moe et al. 1995, S. 258) durch ${}^{13}C$ -NMR-spektroskopische Untersuchungen bestätigt.

Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Alginat-Blocktypen werden entscheidend durch das Verhältnis und die Verteilung der drei Blocktypen in der Polymerkette bestimmt. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, variieren die Anteile von MM-, GG- und alternierenden Sequenzen vor allem mit der Braunalgen-Spezies und dem morphologischen Bereich der Pflanze, welchem das Polysaccharid entstammt. Zudem besteht eine Abhängigkeit der Alginat-Zusammensetzung von der geographischen Herkunft der Alge, ihrem Reifegrad sowie von saisonalen Bedingungen (Moe et al. 1995, S. 250; Rees/Welsh 1977, S. 232).

¹ Die Notation 4C_1 hat folgende Bedeutung: C steht für das englische Wort „chair“, und die Ziffern zeigen an, dass sich im Ring das C-4-Atom oberhalb der Ebene befindet, die aus C-3, C-5, dem Ringsauerstoff-Atom und C-2 gebildet wird, während das C-1-Atom darunter gelegen ist. In Abbildung 3 a) ist die beschriebene Ebene durch blaue Schraffur gekennzeichnet.

² Die Konformationsbezeichnung 1C_4 besagt andererseits, dass hier das C-1-Atom im Unterschied zu der in Fußnote 1 beschriebenen Situation über der durch C-3, C-5, das Ringsauerstoff-Atom und C-2 begrenzten Ebene angeordnet ist, wohingegen das C-4-Atom unterhalb dieser in Abbildung 3 a) blau schraffierten Fläche liegt.

Tab. 1: Durch NMR-Spektroskopie ermittelte typische Zusammensetzungen der Alginate aus verschiedenen Braunalgen (Firma Pro-nova Biopolymer, S. 14; Onsøyen 1997, S. 26; verändert).

Braunalge	% MM	% GG	% (MG + GM)
<i>Laminaria hyberborea</i>			
Stiel	18	58	24
Blätter	36	26	38
<i>Laminaria digitata</i>	39	29	32
<i>Macrocystis pyrifera</i>	40	20	40
<i>Ascophyllum nodosum</i>	56	26	18
<i>Durvillaea potatorum</i>	69	15	16

2.2.2 Alginat als typische Polysaccharid-Vertreter

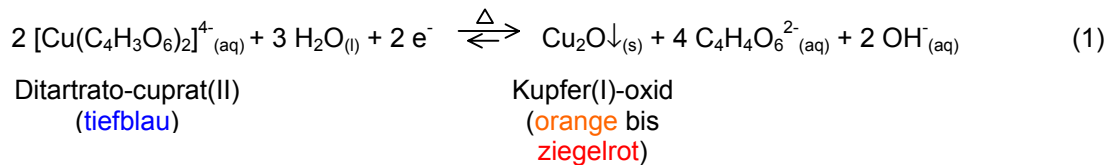
Wie in Teil B, Kapitel 2.2.1 deutlich geworden ist, lassen sich Alginat chemisch als Polysaccharid-Derivate charakterisieren.

Wenn das Thema „Kohlenhydrate“ im Chemieunterricht der Sekundarstufe II behandelt wird, lernen die Schüler in der Regel die Aufbauprinzipien und Eigenschaften von Polysacchariden, wie z. B. Stärke oder Cellulose, kennen. Das in diesem Zusammenhang erworbene Wissen lässt sich auch auf Alginat übertragen: Ebenso wie Stärke und Cellulose haben diese Polysaccharid-Derivate keine reduzierenden Eigenschaften. Unterzieht man jedoch Stärke und Cellulose bzw. Alginat einer sauren Hydrolyse (= Spaltung der glykosidischen Bindungen), so verlaufen Tests auf reduzierende Zucker mit den Hydrolysaten positiv.

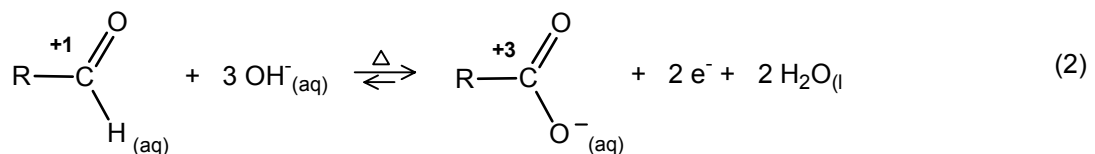
Typische Nachweismethoden, die im Chemieunterricht zur Unterscheidung reduzierender und nicht reduzierender Zucker angewandt werden, sind die Silberspiegel- und die Fehling-Probe (Amann et al. 1989, S. 266; Asselborn/Jäckel/Risch 1998, S. 360; Risch/Seitz 1995, S. 121; Tausch/von Wachtendonk 1993, S. 52).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein Versuch konzipiert, mit dem sich in dem sauren Hydrolysat eines Natriumalginat-Sols reduzierende Zucker durch positive Fehling-Reaktion nachweisen lassen (vgl. Experiment 1).

Bei der Fehling-Reaktion werden mit Tartrat komplexierte Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung zu Kupfer(I)-Oxid reduziert.



Es wird häufig davon ausgegangen, dass bei der Fehling-Reaktion gemäß Gleichung (2) die Aldehyd-Gruppen von in offenkettiger Form vorliegenden Mono-, Di- oder Oligosacchariden als Reduktans fungieren und unter Elektronenabgabe in Carboxylat-Gruppen überführt werden (vgl. z. B. Vollhardt 1990, S. 1077):



Als eigentliche Reduktionsmittel für das komplexierte Cu^{2+} wirken aber Abbauprodukte der Zucker, die beim Erhitzen in stark alkalischer Lösung entstehen (Christen 1990, S. 102). Dabei handelt es sich unter anderem um sogenannte Triose-Reduktone (Gerstner 1986, S. 7).

Eine Besprechung des tatsächlich bei der Fehling-Reaktion ablaufenden Oxidations-Mechanismus' wäre allerdings für Schüler der Sekundarstufe II zu schwierig. Es bleibt also generell zu überdenken, ob bzw. wie man im Rahmen der Kohlenhydrat-Chemie die Fehling-Probe als Nachweisreaktionen für reduzierende Zucker behandeln kann, ohne dabei sachlich falsche Informationen zu vermitteln oder aber die Lernenden zu überfordern.

2.3 Charakteristische Eigenschaften

2.3.1 Lösungsverhalten

2.3.1.1 Allgemeine Aspekte

Alginat zeigen aufgrund ihres Polyanion-Charakters eine relativ hohe Hydrophilie auf. Die Hydratationseigenschaften dieser Algenpolysaccharide werden allerdings entscheidend durch die im Salz vorliegenden Gegenionen mitbestimmt: Während Ammonium-, Alkalimetall- und Magnesiumalginat in kaltem und warmem entionisiertem Wasser Lösungen von hoher Viskosität bilden, sind die Salze der übrigen Erdalkalimetalle sowie die Verbindungen von Alginat mit anderen zwei- und mehrwertigen Metall-Kationen wasserunlöslich (Voragen/Pilnik 1994, S. 38).

Bei einer Dispersion des polymeren Feststoffes Alginat im Dispersionsmittel Wasser handelt es sich nicht um eine echte, sondern um eine kolloidale Lösung oder ein Sol (vgl. Theoretischer Teil, Kapitel 2.3.1.3). Alginat gehören zu den so genannten hydrophilen Kolloiden, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sich die kolloidal gelösten Teilchen in erster Linie durch Umhüllung mit Wasser-Molekülen stabilisieren (Holleman/Wiberg 1985, S. 766, 768).

Die Hydrophilie der Polyuronat-Verbindungen bedingt andererseits auch deren Unlöslichkeit in unpolaren organischen Solventien (Voragen/Pilnik 1994, S. 38).

2.3.1.2 Herstellung von Natriumalginat-Solen

Im Gegensatz zu den Lösungen anorganischer Salze lassen sich Alginat-Sole nicht einfach durch Einbringen des Feststoffes in entionisiertes Wasser herstellen:

Einzelne Alginat-Partikel sind zwar sehr gut wasserlöslich, aber sobald eine größere Menge des Polysaccharid-Derivats mit dem Solvens in Kontakt kommt, entstehen Klumpen. Deren Oberfläche ist mit einer Schicht aus hochviskosem Alginat-Sol überzogen, die das Vordringen weiterer Lösungsmittel-Moleküle in das noch nicht mit Wasser befeuchtete Innere des Klumpens erschwert.

Dies hat eine zeitliche Verzögerung der vollständigen Auflösung des Alginats zur Folge: „Solution time will then be governed by the solution rate of the solvated layer on the exterior of the clump rather than by the solution rate of the individual granule [of alginate] [...]“ (Firma Kelco 1987, S. 35).

Als entscheidende Voraussetzung für die effiziente Herstellung eines wässrigen Alginat-Sols ist daher eine möglichst gleichmäßige Dispersion der Algenpolysaccharid-Partikel im Lösungsmittel anzusehen. Zu diesem Zweck werden in der Industrie verschiedene Spezialmethoden angewandt (vgl. z. B. Firma Kelco 1987, S. 35 f.; Firma Pronova Biopolymer, S. 16; Sime 1990, S. 59 f.), die aber aufgrund ihres hohen apparativen Aufwandes unter schulischen und universitären Bedingungen nur schwer zu realisieren sind.

In der vorliegenden Arbeit soll daher das Prinzip einer vereinfachten experimentellen Vorgehensweise vorgestellt werden (vgl. Experiment 2):

Für die Herstellung eines Natriumalginat-Sols erwärmt man in einem Becherglas passender Größe eine etwa 4/5 des Gesamtlösungsvolumens entsprechende Menge entionisierten Wassers unter Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch auf $\vartheta = 70\text{ °C}$. Nach Abstellen der Heizung wird die Rührgeschwindigkeit so stark erhöht, dass sich um den Rührfisch ein trichterförmiger Wirbel (= Vortex) bildet. Daraufhin siebt man die benötigte Natriumalginat-Portion mit Hilfe eines Haushaltssiebs langsam und in kleinen Portionen auf die obere Vortexwand (Bader 1997, S. 205; Firma Kelco 1987, S. 35). Das bis zur vollständigen Homogenisierung gerührte und auf Raumtemperatur abgekühlte Natriumalginat-Sol wird anschließend durch Zufügen von entionisiertem Wasser auf das gewünschte Endvolumen gebracht.

Für die Dispersion des Alginats kommen industriell anstelle von Sieben Spezialapparaturen zum Einsatz (vgl. z. B. Firma Kelco 1987, S. 36). Auch das von Bader (1997, S. 205) vorgeschlagene Erhitzen des Lösungsmittels wird im großtechnischen Rahmen nicht praktiziert, da dort Hochgeschwindigkeitsmischer zur Verfügung stehen, mit deren Hilfe sich auch extrem viskose Sole des Algenpolysaccharids effektiv durchmischen lassen.

Bedenkt man jedoch, dass eine Temperaturerhöhung um $5,5\text{ °C}$ bei Alginat-Solen eine reversible Verringerung der Viskosität um etwa 12,5 % bedingt (Cotrell/Kovacs 1980, S. 2-7), so stellt das vorherige Erwärmen des zur Herstellung der Lösung verwendeten entionisierten Wassers eine durchaus sinnvolle Maßnahme dar, um die relativ schwache Rührleistung des Magnetrührers zu kompensieren.

Es hat sich allerdings nicht als empfehlenswert erwiesen, das Solvens gemäß der Angabe bei Bader (1997, S. 205) auf Temperaturen oberhalb von 70 °C zu bringen, da unter diesen Bedingungen die Gefahr besteht, dass das Natriumalginat durch den aufsteigenden Wasserdampf bereits während der Operation des Einsiebens in den Vortex im Haushaltssieb feucht wird und verklumpt.

2.3.1.3 Kolloid-Charakter von Natriumalginat-Lösungen

Charakteristika kolloid-disperser Systeme

Wie bereits in Teil B, Kapitel 2.3.1.1 angedeutet, bilden Alginat in Wasser keine echten, sondern kolloidale Lösungen.

Kolloide (von grch. „kolla“ = Leim und „eidos“ = Form, Aussehen) sind disperse Systeme oder Dispersionen, in denen die dispergierte Substanz, die man auch als disperse Phase bezeichnet, in charakteristisch zerteilter Form in einem Dispersionsmittel vorliegt. Die dispergierte Substanz und das Dispersionsmittel sind dabei in der Regel zwei Stoffe mit unterschiedlichen Aggregatzuständen (Falbe/Regitz 1995 c, S. 2299). In diesem Exkurs sollen nur fest-flüssige Dispersionen betrachtet werden.

Dispergiert man einen Feststoff in einem flüssigen Lösungsmittel, so lassen sich in Abhängigkeit vom Teilchendurchmesser der dispersen Phase die in Tabelle 2 angegebenen Zustände unterscheiden (Holleman/Wiberg 1985, S. 764 f.).

Tab. 2: Einteilung von fest-flüssigen dispersen Systemen nach dem Teilchendurchmesser der dispersen Phase (nach Angaben in Holleman/Wiberg, 1985, S. 764).

Disperse Systeme (s/l)	Teilchendurchmesser der dispersen Phase	Beispiele
Echte Lösung	< 1 nm	Lösungen von Glucose oder Natriumchlorid
Kolloidale Lösung <ul style="list-style-type: none"> • Molekül-Kolloide • Micell-Kolloide 	10 – 100 nm	Lösungen synthetischer oder natürlicher Makromoleküle (z. B. Alginat) Konzentrierte Tensid-Lösungen
Suspension	> 1.000 nm	Aufschlämmung von Aktivkohle in Wasser

Echte Lösungen liegen dann vor, wenn der Feststoff im Lösungsmittel so weit zerteilt ist, dass der Durchmesser der solvatisierten Teilchen 1 nm nicht überschreitet. Zu diesem Typ gehören z. B. wässrige Lösungen von Natriumchlorid (einzelne hydratisierte Kationen und Anionen) sowie von Glucose oder Harnstoff (kleine hydratisierte Moleküle).

Haben die Teilchen der dispersen Phase Durchmesser im Bereich von 10 – 100 nm, so spricht man von einer kolloidalen Lösung oder einem Sol. Solche Partikeldimensionen findet man z. B. in Lösungen von natürlichen und synthetischen Makromolekülen sowie in ausreichend konzentrierten Tensid-Lösungen, in denen sich die relativ kleinen Einzelmoleküle zu höheren Aggregaten zusammenlagern (Micellen-Bildung; s. u.).

Während echte und kolloidale Lösungen dem Auge des Betrachters als klare Flüssigkeiten erscheinen, ist dies bei Suspensionen nicht mehr der Fall. Hier sind die dispergierten Teilchen mit Durchmessern oberhalb von 1.000 nm so dimensioniert, dass sie ohne opti-

sche Hilfsmittel als Trübung in der Flüssigkeit erkennbar sind. Als Beispiel für ein solches grobdisperses sei eine Suspension von Aktivkohle in Wasser genannt.

Disperse Systeme mit Teilchendurchmessern zwischen 1 und 10 nm sowie 100 und 1.000 nm stellen Zwischenzustände dar. Dies macht deutlich, dass es sehr schwierig ist, eine scharfe physikalisch-chemische Abgrenzung zwischen echten und kolloidalen Lösungen sowie kolloidalen Lösungen und Suspensionen zu festzulegen (Falbe/Regitz 1995 c, S. 2299; Holleman/Wiberg 1985, S. 764).

Einteilung von Kolloiden

Kolloidale Lösungen lassen sich nach unterschiedlichen Prinzipien noch weiter kategorisieren (Falbe/Regitz 1995 c, S. 2299; Holleman/Wiberg 1985, S. 766 f.). Exemplarisch sollen im Rahmen dieses Exkurses die folgenden diskutiert werden: zum ersten die *Bindungsart zwischen den Atomen der Kolloid-Teilchen* und zum zweiten das *Verhalten der Kolloid-Teilchen gegenüber dem Dispersionsmittel*:

(1) Bindungsart zwischen den Atomen der Kolloid-Teilchen

Gemäß einem Vorschlag von Staudinger (Falbe/Regitz 1995 c, S. 2300 ff.) teilt man Kolloide unter Berücksichtigung der Bindungsart zwischen den Atomen der Kolloid-Teilchen in vier Klassen ein, von denen hier nur die *Molekül-* und die *Assoziations- bzw. Micell-Kolloide* näher betrachtet werden sollen. Abbildung 4 veranschaulicht die Erläuterungen im Text.

(1.1) Molekül-Kolloide

Hier sind die Kolloid-Teilchen solvatisierte Makromoleküle mit $10^3 - 10^9$ kovalent aneinander gebundenen Atomen. Stoffe, die aus so großen Molekülen bestehen, können nur kolloid in Lösung gehen, da sie bezüglich ihrer Teilchengrößen deutlich oberhalb von 10 nm liegen (Falbe/Regitz 1995 c, S. 2300). Zu der Klasse der Molekül-Kolloide gehören auch Alginat- und Carrageenan-Sole.

(1.2) Assoziations- oder Micell-Kolloide

Alginat (Polyuronat) und Carrageenane (sulfatierte Galactane) verfügen über gleiche funktionelle Gruppen wie Vertreter der Tenside, die den Schülern normalerweise bereits aus dem Chemieunterricht der Sekundarstufe I bekannt sind (HKM 1996, S. 23). Es handelt sich dabei um Seifen (Carboxylat-Gruppen) und Monoalkylsulfate (Sulfat-Funktionen). Dass auch Tenside kolloidale Lösungen bilden, hat aber ganz andere Ursachen als bei den makromolekular vorliegenden Algenpolysacchariden. Dies soll im Folgenden kurz erläutert werden:

Unter Tensiden versteht man Substanzen, die die Grenzflächenspannung herabsetzen. Tensid-Moleküle sind charakteristischerweise aus einem hydrophilen und einer hydrophoben Teil aufgebaut. Während der hydrophile Teil in der Regel aus einer polaren funktionellen Gruppe (z. B. $-\text{COO}^-$, $-\text{OSO}_3^-$ oder $-\text{SO}_3^-$) besteht, handelt es sich bei dem hydrophoben Teil meist um einen unpolaren Kohlenwasserstoff-Rest (Falbe/Regitz 1995 f, S. 4495 ff.).

Aufgrund ihres besonderen chemischen Aufbaus können sich Tensid-Moleküle bei Dispersion in einem Solvens unter bestimmten Bedingungen zu Assoziaten mit kolloidalen Dimensionen, so genannten Micellen, zusammenlagern. Dies geschieht sowohl unter dem Einfluss von zwischenmolekularen Kräften als auch von Wechselwirkungen der dispergierten Moleküle mit dem Dispersionsmittel (Falbe/Regitz 1995 c, S. 2302).

Wenn geringe Mengen eines Tensids in Wasser gebracht werden, ordnen sich die Tensid-Moleküle in einer monomolekularen Schicht an der Phasengrenzfläche an: Dabei tauchen ihre hydrophilen Gruppen in die wässrige Phase ein, wohingegen ihre hydrophoben Reste in Richtung der gasförmigen Phase (Luft) weisen (Falbe/Regitz 1995 f, S. 4495 ff.; Mortimer 1987, S. 557; Vollhardt 1990, S. 788 f.).

Wird die Tensid-Konzentration jedoch so weit gesteigert, dass die Wasseroberfläche vollständig mit Molekülen belegt ist, können sich auch höhere Aggregate, sogenannte Micellen, ausbilden. Die charakteristische Konzentration, oberhalb der dieser Vorgang einsetzt, wird als Kritische Micellbildungs-Konzentration (KMK) bezeichnet.

In den sphärischen Micellen sind die Tensid-Moleküle so angeordnet, dass sich ihre hydrophoben Alkyl-Ketten zum Kugelinneren hin orientieren, wo sie durch hydrophobe Wechselwirkungen (van-der-Waals-Kräfte) zusammengehalten werden und möglichst wenig mit dem Wasser in Berührung kommen. Dahingegen sind die polaren Gruppen der Tensid-Moleküle zur Kugeloberfläche gewandt, werden von Wasser-Molekülen solvatisiert und vermitteln so die Löslichkeit der Micellen (Falbe/Regitz 1995 d, S. 2769 f.; Falbe/Regitz 1995 f, S. 4495 ff.; Mortimer 1987, S. 557; Vollhardt 1990, S. 788 f.)

Die Unterschiede zwischen Molekül- und Micell-Kolloiden werden in Abbildung 4 nochmals zusammenfassend dargestellt.



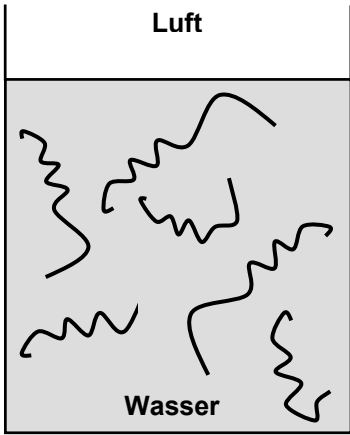
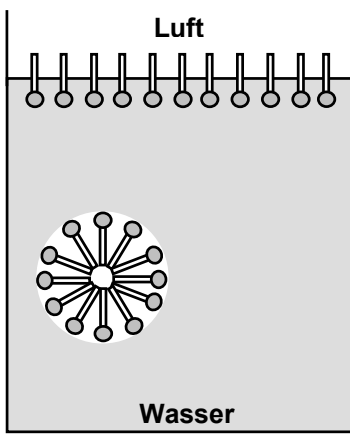
Molekül-Kolloide	Assoziations- oder Micell-Kolloide
<p>z. B. Alginat</p> <p>GG-Blöcke = </p> <p>MM-, GM-, MG-Blöcke = </p>	<p>z. B. Tenside</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-right: 10px;">hydrophob</div> <div style="margin-right: 10px;">—</div> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 2px; text-align: center;">hydro- phil</div> <div style="margin-left: 10px;">polare funktionelle Gruppen, wie z. B. -COO⁻, -OSO₃⁻ oder -SO₃⁻</div> </div> <p>z. B. unpolarer Alkyl-Rest</p>
<div style="text-align: center;">Luft</div>  <div style="text-align: center;">Wasser</div>	<div style="text-align: center;">Luft</div>  <div style="text-align: center;">Wasser</div>

Abb. 4: Unterschiede zwischen Molekül- und Assoziations- oder Micell-Kolloiden (verändert nach Falbe/Regitz 1995 f, S. 4495; Mortimer 1987, S. 557).

(2) Verhalten der Kolloid-Teilchen gegenüber dem Dispersionsmittel

Ein weiteres Prinzip, Kolloide in Unterklassen zu unterteilen, trägt den Wechselwirkungen zwischen den Kolloid-Teilchen mit dem Dispersionsmedium Rechnung. Handelt es sich bei dem Dispersionsmittel um Wasser, so unterscheidet man auf dieser Basis so genannte *hydrophile* und *hydrophobe* Kolloide (Falbe/Regitz 1995 c, S. 2300; Holleman/Wiberg 1985, S. 766 f.).

(2.1) Hydrophile Kolloide

Die Teilchen hydrophiler Kolloide stabilisieren sich durch Hydratation, d. h. durch Umhüllung mit den Molekülen des Lösungsmittels Wasser. Zu dieser Kolloid-Klasse gehören auch Alginat, deren kolloidale Lösungen durch Dispersion der Algenpolysaccharide in Wasser herzustellen sind.

(2.2) Hydrophobe Kolloide

Hydrophobe Kolloide entstehen, wenn man Stoffe, die eigentlich wasserunlöslich sind, durch Anwendung bestimmter Kunstgriffe (z. B. Kondensation in echter Form gelöster oder Dispersion suspendierter Teilchen) kolloidal in Lösung bringt. Ihre Stabilisierung erfolgt durch Adsorption bestimmter, in der Lösung vorhandener Kationen oder Anionen. Die daraus resultierende gleichnamige Aufladung der Kolloid-Teilchen verhindert, dass sie sich zu größeren Verbänden zusammenlagern und ausflocken.

Nachweis von Kolloid-Teilchen in Natriumalginat-Lösungen

Da die Teilchen in kolloidalen Lösungen mit Durchmessern zwischen 10 und 100 nm so klein sind, dass ihre Partikeldimensionen unterhalb der Wellenlänge des sichtbaren Lichtes (ca. 400 – 800 nm) liegen, können sie – wie die Teilchen in echten Lösungen – weder mit bloßem Auge erkannt noch unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Im Gegensatz zu Suspensionen erscheinen Sole daher noch als homogen.

Dennoch gibt es eine Möglichkeit, kolloidale Lösungen mit Hilfe einer Lichtquelle von echten zu unterscheiden: Wird ein starkes Lichtbündel durch eine Kolloid-Teilchen enthaltende Lösung geschickt, so kann man bei seitlicher Beobachtung den Gang des Lichts verfolgen. Dies liegt darin begründet, dass die dispergierten Teilchen das Licht in alle Richtungen streuen, wodurch seitlich eine leuchtende Trübung zu beobachten ist. Diese Erscheinung wurde 1857 von dem englischen Naturforscher Faraday entdeckt und von dem irischen Physiker Tyndall näher untersucht und wird daher Faraday-Tyndall-Effekt genannt. In echten Lösungen bleibt der Lichtstrahl hingegen unsichtbar; sie werden daher auch als optisch leer bezeichnet (Falbe/Regitz 1995 c, S. 2302; Holleman/Wiberg 1985, S. 765). Zu den physikalischen Hintergründen der Lichtstreuung vgl. auch Atkins (1987, S. 632 f.).

In Experiment 3 der vorliegenden Arbeit wird das Auftreten des Faraday-Tyndall-Effektes bei Natriumalginat-Solen mit Hilfe einer Taschenlampe demonstriert. In den zum Vergleich eingesetzten echten Lösungen des Monosaccharids Glucose und des Salzes Natriumchlorid kann man den Gang des Lichtstrahls nicht verfolgen (vgl. Abbildung 5).

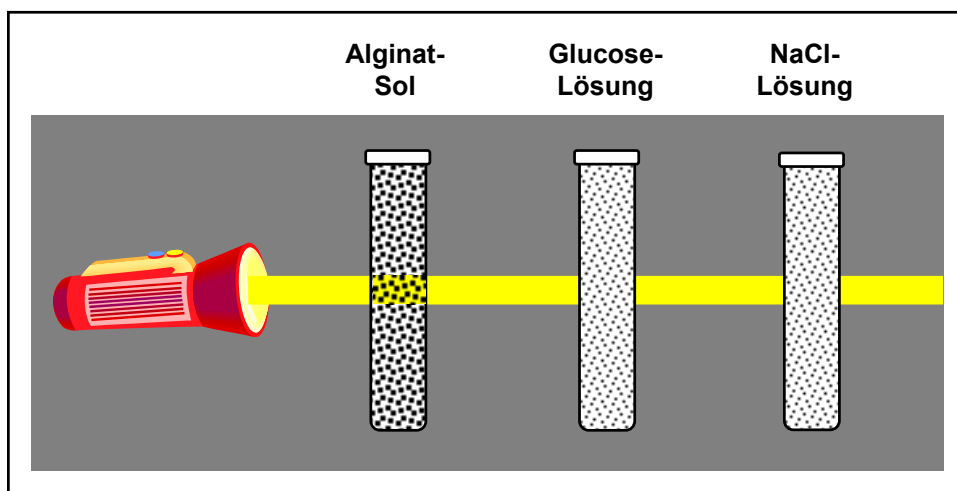


Abb. 5: Nachweis kolloidaler Teilchen in Natriumalginat-Lösungen mit Hilfe des Faraday-Tyndall-Effektes (vgl. Experiment 3).

2.3.2 Gelbildung

2.3.2.1 Allgemeine Charakteristika von Solen und Gelen

Wie bei anderen kolloidalen Lösungen können auch im Falle von Alginat-Solen unter bestimmten Bedingungen Sol-Gel-Übergänge eintreten:

Während Sole inkohärente Systeme darstellen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass kein Zusammenhalt zwischen den im Dispersionsmittel fein verteilten Teilchen besteht, liegt in Gelen die dispergierte Substanz im Dispersionsmedium in kohärenter Form, d. h. verknüpft zu einem räumlichen Netzwerk, vor. In die Maschen des dreidimensionalen Gelgerüsts werden die Moleküle des Dispersionsmittels eingelagert (Falbe/Regitz 1995 b, S. 1511; Falbe/Regitz 1995 c, S. 2299 f.). Abbildung 6 veranschaulicht diese Zusammenhänge schematisch:

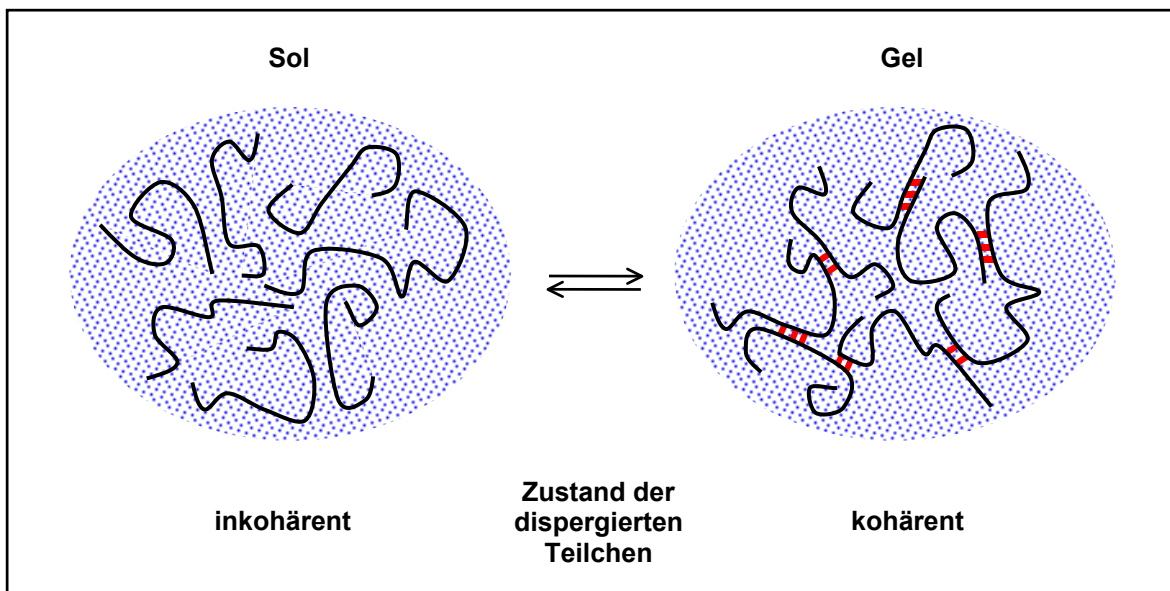


Abb. 6: Gegenüberstellung der Charakteristika von Solen und Gelen: Die Moleküle des Dispersionsmittels werden durch blaue Punkte symbolisiert, die Verknüpfungspunkte zwischen den dispergierten Teilchen im Gel sind rot dargestellt.

Die Art der Verknüpfung variiert von Gel zu Gel: Zu den für Polysaccharide relevanten Wechselwirkungen zwischen den am Aufbau des Gelnetzwerkes beteiligten Teilchen gehören beispielsweise Wasserstoffbrücken- und Ionenbindungen (Rees/Welsh 1977, S. 229).

2.3.2.2 Gelbildung bei Alginaten

Im Anschluss an die Diskussion allgemeiner Aspekte zum Sol-Gel-Übergang sollen die für Alginate charakteristischen Geliervorgänge erläutert werden, nämlich die Bildung von **Calciumalginat-** und **Alginsäure-Gelen**:

Calciumalginat-Gele

Die Gelbildung von Alginat mit Calcium-Ionen ist sowohl für die Gewinnung als auch für zahlreiche Anwendungen des Algenpolysaccharids von grundlegender Bedeutung. Sie ist darauf zurückzuführen, dass sich Polyguluronat-Sequenzen, deren Kettenlänge im Bereich von etwa 20 Monomer-Resten liegt, durch Chelatisierung von Ca^{2+} -Ionen assoziieren. Aufgrund der geknickten Form der GG-Blöcke entstehen bei deren Zusammenlagerung Hohlräume, welche die passende Größe für die Einlagerung von Calcium-Ionen haben. Innerhalb eines Hohlräumens wird jedes Ca^{2+} -Ion von insgesamt zehn Sauerstoffatomen koordinativ gebunden (Morris 1986, S. 16; Rees/Welsh 1977, S. 233).

Abbildung 7 gibt schematisch das auf Grant et al. (1973, S. 195 – 198) zurückgehende Koordinationsmodell für die Bindung von Calcium-Ionen durch Polyguluronat-Sequenzen wieder, welches aus leicht ersichtlichen Gründen unter dem Namen „Eierkarton-Modell“ bekannt geworden ist: „The buckled chain is shown as a two-dimensional analogue of a corrugated egg-box with interstices in which the cations may pack and be coordinated [...]“ (Grant et al. 1973, S. 197).

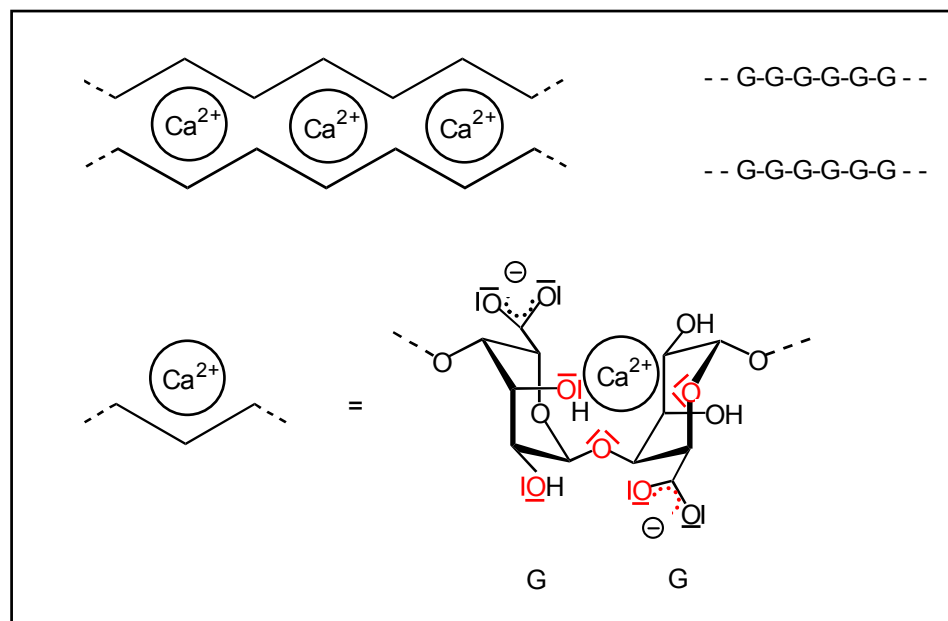


Abb. 7: Calcium-Bindung durch Polyguluronat-Sequenzen nach dem von Grant et al. (1973) vorgeschlagenen „Egg-Box Modell“: Die fünf Sauerstoff-Atome, mit welchen jedes Ca^{2+} -Ion innerhalb eines Guluronat-Dimers koordiniert ist, sind farbig hervorgehoben (Abbildung nach Smidsrød/Draget 1996, S. 10; verändert).

Von Morris/Rees/Thom (1978, S. 145 – 154) durchgeführte gleichgewichtsdialytische Untersuchungen zeigen, dass die Calcium-Bindung durch GG-Sequenzen stöchiometrisch erfolgt: Jedes Ca^{2+} -Ion wird von vier Guluronat-Resten koordinativ gebunden. Auf der Basis dieses Befundes kann die Aussage getroffen werden, dass sich Polyguluronat-Blöcke in Gegenwart von Calcium-Ionen lediglich zu Dimeren assoziieren, aber nicht – wie auch denkbar wäre – Schichtstrukturen ausbilden, an denen mehrere GG-Sequenzen beteiligt sind.

Anders als im Falle der Polyguluronat-Blöcke findet bei den Polymannuronat- und alternierenden Sequenzen keine Assoziation durch Ca^{2+} -Ionen statt. Diese bilden vielmehr die Maschen des Gelnetzwerkes, in welche Wasser eingelagert werden kann (Morris 1986, S. 16; Rees/Welsh 1977, S. 233).

Experimentelle Veranschaulichung

Um die Gelbildungsfähigkeit der Alginat mit Calcium-Ionen zu demonstrieren, wurde ein einfacher, aber sehr eindrucksvoller Versuch entwickelt (vgl. Experiment 4 a)):

Bringt man Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) in gleichmäßigem, dünnem Strahl in eine Calciumchlorid-Lösung ($w = 0,06$) ein, so fällt spontan fadenförmiges Calciumalginat-Gel aus, welches nach kurzer Aushärtezeit mit einer Pinzette aus der Geliertlösung entfernt werden kann. Abbildung 8 dient der Veranschaulichung des Versuchsergebnisses.

Lütke Twenhöven (1997, S. 43) und Waldman et al. (1998, S. 1430 f.) schlagen – unabhängig von Experiment 4 a) – ähnliche experimentelle Vorgehensweisen für die Gel-Herstellung vor.

Zur Veranschaulichung der submikroskopischen Ursachen der Gelbildung, kann man mit Hilfe eines Eierkartons und Pappmaché- bzw. Styroporkugeln ein vereinfachtes Koordinationsmodell für die Einlagerung von Calcium-Ionen in den Hohlräumen der Polyguluronat-Blöcke anfertigen (vgl. Abbildung 9).

Eine detaillierte Anleitung für die Anfertigung von Modell 1 findet sich in Kapitel 3.1.2 des experimentellen Teils.



Abb. 8: Calciumalginat-Gel in Fadenform (Experiment 4 a)).

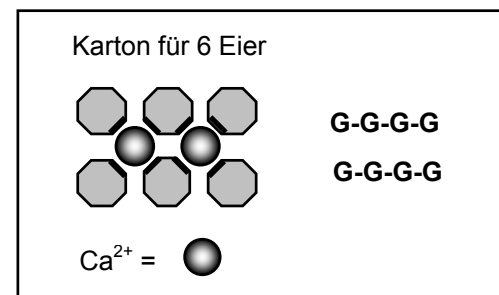


Abb. 9: „Eierkarton-Modell“ für die Bindung von Calcium-Ionen durch GG-Sequenzen (vgl. Teil D, Modell 1).

Alginsäure-Gele

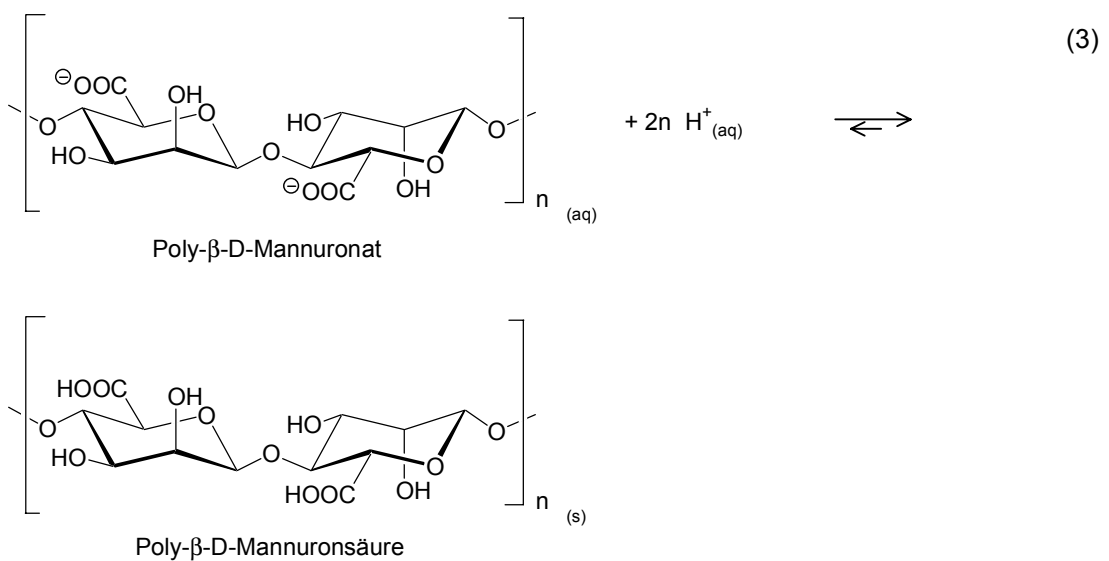
Eine zweite wichtige Eigenschaft der Alginat besteht darin, dass sie auch mit starken Säuren Gele bilden. Während der Mechanismus der Gelbildung von Alginat-Polyanionen mit Calcium-Ionen weitgehend aufgeklärt ist, besteht deutlich weniger Klarheit über die Struktur der Alginsäure-Gele (Smidsrød/Draget 1996, S. 11). Bekannt sind folgende Fakten:

[...] an alginate solution [...] may form gels by lowering of pH below the pK_a -value of the uronic acid residues [...]. These gels, often just called 'acid gels', have been proposed to be stabilized by intermolecular hydrogen bonds [...]. There is, however, very little detailed molecular understanding [...] of these gels.

Draget/Skjåk-Bræk/Smidsrød (1994, S. 31)

Die chemischen Hintergründe der Gelbildung von Alginat mit Säure sollen im Folgenden näher betrachtet werden: Für β -D-Mannuron- und α -L-Guluronsäure-Monomere ermittelte Haug (1964 a; zitiert in Moe et al. 1995, S. 262) durch potentiometrische Titration die pK_s -Werte 3,38 und 3,65. Die Säurekonstanten der entsprechenden Polymer-Sequenzen variieren zwar mit der im Sol vorliegenden Alginat-Konzentration sowie der Ionenstärke des Solvens, zeigen aber nur geringfügige Abweichungen von den angegebenen Werten (Haug 1964 a; zitiert in Moe et al. 1995, S. 262).

Bei Zugabe des Natriumalginat-Sols zu verdünnter Salzsäure ($c = 1 \text{ mol/L}$), deren pH-Wert etwa 0 beträgt, gehen die Alginat-Polyanionen mit den Oxonium-Ionen eine Säure-Base-Reaktion nach Brønsted ein. Diese sei in Gleichung (3) exemplarisch für Poly- β -D-Mannuronat formuliert:



Durch die Protonierung der Carboxylat-Gruppen wird die gegenseitige elektrostatische Abstoßung der Polysaccharid-Ketten verringert, so dass sich diese einander nähern können. Ein dreidimensionales Gelgerüst entsteht dann in der Weise, dass sich Homopolymer-Sequenzen, d. h. Poly- β -D-Mannuron- und Poly- α -L-Guluronsäure-Blöcke, durch Ausbildung intercatenarer Wasserstoff-Brückenbindungen assoziieren. Unterbrechungen dieser geordneten Struktur durch alternierende Sequenzen sind vermutlich für die Entstehung von Zwischenräumen im Gelnetzwerk verantwortlich, in welche die Moleküle des Dispersionsmittels Wasser eingelagert werden (Smidsrød/Dragnet 1996, S. 10).

Experimentelle Veranschaulichung

In Analogie zur Vorgehensweise bei Calciumalginat-Gelen können Alginsäure-Gelfäden hergestellt werden, indem man Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) langsam und in dünnem Strahl in verdünnte Salzsäure ($c = 1 \text{ mol/L}$) einfließen lässt (vgl. Experiment 4 b)). Nach kurzer Zeit bildet sich ein weißes Alginsäure-Gel in Fadenform, das unter Zuhilfenahme einer Pinzette aus der Gelierlösung entnommen wird. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis des beschriebenen Versuches.



Abb. 10: Fadenförmiges Alginsäure-Gel (Experiment 4 b)).

2.3.3 Stabilisierung von Emulsionen und Suspensionen

2.3.3.1 Hintergrundinformationen

Das charakteristische Sol- und Gelbildungsverhalten von Alginaten stellt die Grundlage für viele Einsatzzwecke dieser Algenpolysaccharide dar. Darüber hinaus sind anwendungstechnisch zwei weitere Eigenschaften der anionischen Polysaccharid-Derivate von besonderer Relevanz. Dabei handelt es sich um die Fähigkeit der Alginat, als **Emulsions-** und **Suspensionsstabilisatoren** zu wirken.

Emulsionen (Falbe/Regitz 1995 b, S. 1158 f.)

Emulsionen sind disperse Systeme, die aus mindestens zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten bestehen. Dabei fungiert eine Flüssigkeit als Dispersionsmittel, d. h. sie stellt die kontinuierliche oder äußere Phase dar, in der die andere Flüssigkeit in Form feiner Tröpfchen verteilt ist. Die dispergierte Flüssigkeit wird auch als disperse oder innere Phase bezeichnet.

Viele natürliche und technische Emulsionen bestehen aus einer Wasser- und einer Öl-Phase, die auf zwei unterschiedliche Arten ineinander verteilt sein können (vgl. auch Abbildung 11):

Besteht die disperse Phase aus Öl und die kontinuierliche aus Wasser, so spricht man von einer O/W-Emulsion (engl. „oil in water“). Beispiele für diesen Emulsions-Typ sind Milch, Mayonnaise und Speiseeis. Liegt jedoch eine Verteilung von Wasser-Tröpfchen in Öl vor, dann handelt es sich bei dem dispersen System um eine W/O-Emulsion (engl. „water in oil“). Emulsionen dieses Typs sind z. B. Butter, Margarine und Salben.

Zu welchem Typ eine Emulsion gehört, wird u. a. durch die Zusammensetzung und das Verhältnis der beiden ineinander verteilten Phasen sowie den zur Stabilisierung verwendeten Emulgator (s. unten) bestimmt. Selbst wenn die disperse Phase anteilmäßig größer ist (vgl. z. B. Mayonnaise mit bis zu 80 % Öl), bestimmt die kontinuierliche Phase den Grundcharakter einer Emulsion. So lässt sich z. B. das Vorliegen einer O/W-Emulsion dadurch nachweisen, dass man nach Zusatz eines Salzes eine erhöhte elektrische Leitfähigkeit misst. Dies ist bei einer W/O-Emulsion hingegen nicht der Fall.

O/W- und W/O-Emulsionen neigen dazu, sich wieder in eine Öl- und eine Wasser-Phase aufzutrennen (vgl. Abbildung 11). Dies liegt darin begründet, dass der entmischte Zustand der thermodynamisch stabilere ist.

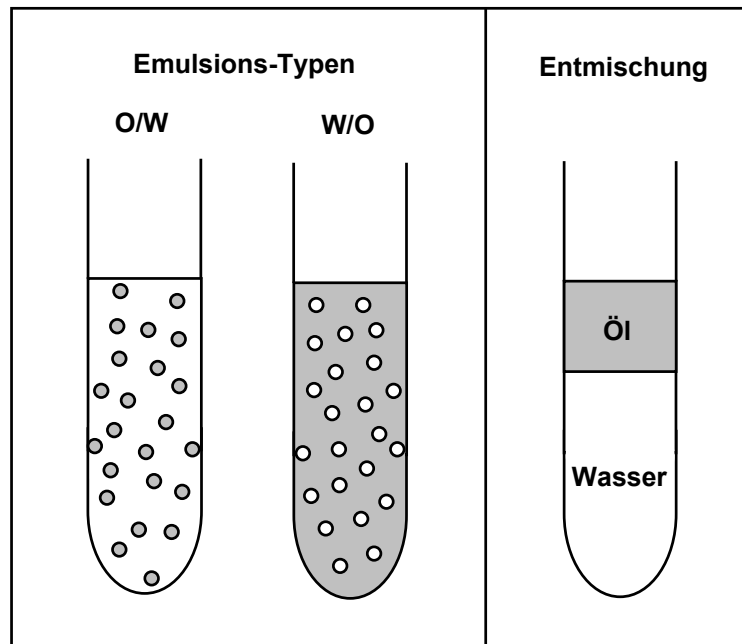


Abb. 11: Charakteristika von Emulsionen mit einer Öl- und einer Wasser-Phase: Möglichkeiten der Phasenverteilung und Entmischung der beiden Phasen.

Durch Zusatz von Emulgatoren kann man jedoch die Entmischung einer Emulsion unterbinden oder zumindest zeitlich hinauszögern. Emulgatoren stabilisieren eine Emulsion dadurch, dass sie das Zusammenfließen der Tröpfchen der dispersen Phase verhindern. Stoffe, die diese Fähigkeit haben, sind grenz- bzw. oberflächenaktiv, d. h. sie reichern sich an der Grenzschicht zwischen den Phasen an und verringern die Grenzflächenspannung. Der Emulgator lädt dabei entweder die dispergierten Tröpfchen elektrostatisch auf, so dass sie sich gegenseitig abstoßen oder umgibt sie mit einer stabilen, häufig hochviskosen Schutzschicht (Falbe/Regitz 1995 b, S. 1156).

Entscheidend für die Wirksamkeit eines Emulgators ist sein amphiphiler molekularer Aufbau: Jedes Emulgator-Molekül enthält mindestens eine polare funktionelle Gruppe (z. B. COO^- , -NH_3^+ , -OH) und einen unpolaren Rest (z. B. Alkyl- oder Aryl-Gruppen). Die gleichzeitige Anwesenheit einer hydrophilen und einer lipophilen Gruppe macht es möglich, dass der Emulgator sowohl Wechselwirkungen mit der Wasser- als auch der Öl-Phase eingehen kann.

Suspensionen (Falbe/Regitz 1995 e, S. 4401 f.)

Suspensionen sind Systeme, bei denen unlösliche Feststoff-Teilchen mit Durchmessern von mehr als 1.000 nm in einer Flüssigkeit dispergiert sind. Wird die Suspension nicht stabilisiert, so schwimmen die Teilchen in Abhängigkeit von ihrem spezifischen Gewicht im Laufe der Zeit entweder auf der Oberfläche auf oder setzen sich am Boden ab (vgl. Abbildung 12).

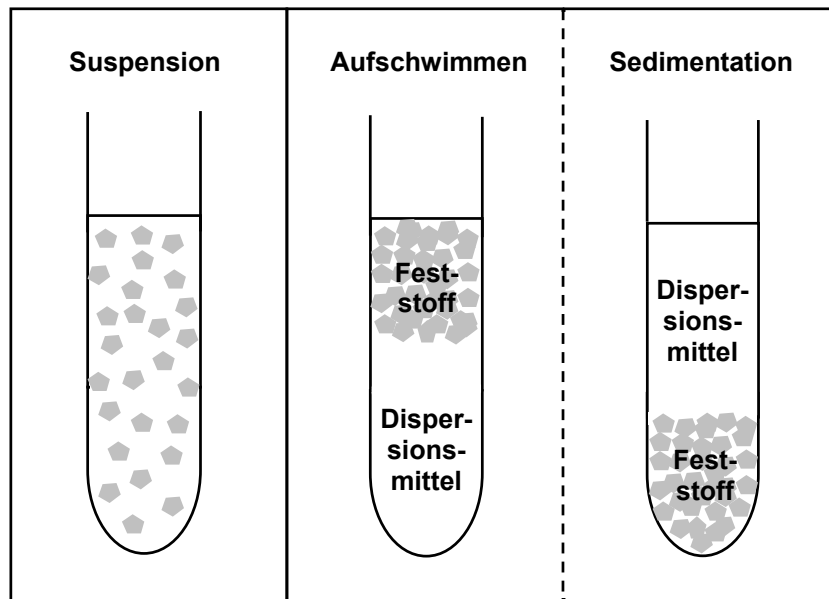


Abb. 12: Charakteristika von Suspensionen: Dispersion der unlöslichen Feststoff-Teilchen in der flüssigen Phase und Destabilisierung der Suspension durch Aufschwimmen bzw. Sedimentation der Feststoff-Partikel.

Um die Stabilität von Suspensionen zu erhöhen, werden grenzflächenaktive Stoffe, wie beispielsweise anionische Tenside, eingesetzt. Durch Herabsetzung der Grenzflächenspannung verbessern diese Substanzen die Benetzung der suspendierten Partikel mit dem Dispersionsmittel und verhindern so deren Absetzen (Falbe/Regitz 1995 e, S. 4401).

2.3.3.2 Alginate als Emulsions- und Suspensionsstabilisatoren

Auch Alginat zeichnen sich als anionische Polysaccharid-Derivate durch eine emulsions- und suspensionsstabilisierende Wirkung aus. Dies beruht auf zwei Effekten (Firma Pronova Biopolymer, S. 18; Onsøyen 1997, S. 41):

Zum einen fungieren die Algenpolysaccharide als Stabilisatoren in O/W-Emulsionen und Suspensionen, weil sie die Viskosität der wässrigen Phase erhöhen und dadurch die Phasenseparation zeitlich verzögern (kinetischer Effekt).

Zum anderen erzeugen Alginat aufgrund ihres Polyanion-Charakters elektrisch geladene Filme an den Berührungsflächen zwischen den dispergierten Öl-Tröpfchen bzw. wasserunlöslichen Partikeln und dem Dispersionsmittel Wasser: Da die Polysaccharid-Derivate zwar polare Carboxylat-Gruppen, aber keinen gänzlich unpolaren Rest haben, verfügen sie nicht über den für grenzflächenaktive Stoffe typischen amphiphilen Molekül-Aufbau. Dennoch richten sich die tendenziell hydrophoberen Reste der Polysaccharid-Ketten stärker in Richtung der unpolaren Öl-Tröpfchen bzw. Feststoff-Partikel aus, während die hydrophilen Carboxylat-Funktionen bevorzugt nach außen gekehrt werden, um Wechselwirkungen mit den Wasser-Molekülen eingehen zu können. Die negativ geladenen Alginat-Filme um die dispergierten Teilchen ziehen Ionen mit entgegengesetzter Ladung (z. B. Na^+ -Kationen) an. Die auf diese Weise entstehende elektrische Doppelschicht (Atkins 1990, S. 647) verhindert durch Coulombsche Abstoßungskräfte, dass sich die Öl-Tröpfchen oder Feststoff-Partikel annähern und koaleszieren. Abbildung 13 veranschaulicht die geschilderten Zusammenhänge schematisch:

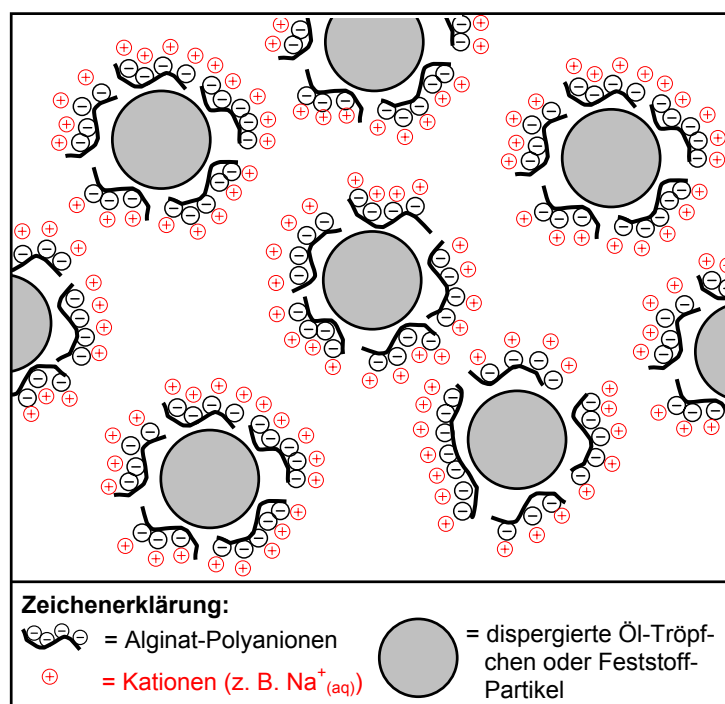


Abb. 13: Stabilisierung von O/W-Emulsionen und Suspensionen durch Alginat – Schematische Darstellung.

Experimentelle Veranschaulichung

Die emulsionsstabilisierende Wirkung von Alginaten wird in Experiment 5 (verändert nach Lutz/Müller 1991, S. 30) näher untersucht: In Reagenzgläsern vermischt man vier Volumenteile unterschiedlich konzentrierter Natriumalginat-Sole ($\rho^* = 5, 10$ bzw. 20 g/L) mit je einem Volumenteil einer Lösung von Sudanrot B in Speiseöl. Die resultierenden Emulsionen werden bezüglich ihres Entmischungsverhaltens untereinander sowie mit einer lediglich Wasser enthaltenden Probe verglichen.

Es wird deutlich, dass die Phasenseparation in alginathaltigen O/W-Emulsionen deutlich verzögert eintritt. Die Emulsionen werden umso effektiver stabilisiert, je höher die Massenkonzentration des verwendeten Algenpolysaccharid-Sols ist.

Experiment 6 stellt einen Grundlagenversuch zur Wirkung von Alginaten als Suspensionsstabilisatoren dar: In einem Reagenzglas versetzt man Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 10$ g/L) mit einer kleinen Portion Seesand und vergleicht die Stabilität der nach Schütteln resultierenden Suspension mit einem Ansatz, in dem eine äquivalente Menge des Feststoffs in entionisiertem Wasser dispergiert wird. Während die Sedimentation der Seesand-Partikel in Wasser sofort erfolgt, tritt sie in der polysaccharidhaltigen Probe verzögert ein.

2.4 Gewinnung aus Braunalgen

2.4.1 Rohstoffquellen und Ernte

Obwohl Alginat als Strukturkomponente in allen Braunalgen enthalten ist, finden als Ausgangsmaterial für die industrielle Gewinnung des Polyuronats lediglich großwüchsige Phaeophyta der Ordnungen Laminariales und Fucales Verwendung. Zu den weltweit wichtigsten Rohstoffquellen zählen die Arten *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyperborea* und *Ascophyllum nodosum*. In geringerem Umfang werden aber auch Vorkommen von *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ecklonia maxima*, *Lessonia negrescens* sowie Spezies der Gattungen *Durvillaea* und *Fucus* für die Alginat-Produktion genutzt (Firma Pronova Biopolymer, S. 3; Jensen 1995, S. 86; King 1983, S. 119 ff.; Voragen/Pilnik 1994, S. 35).

Abbildung 14 gibt einen Überblick über die Lebensräume kommerziell bedeutsamer Braunalgen:

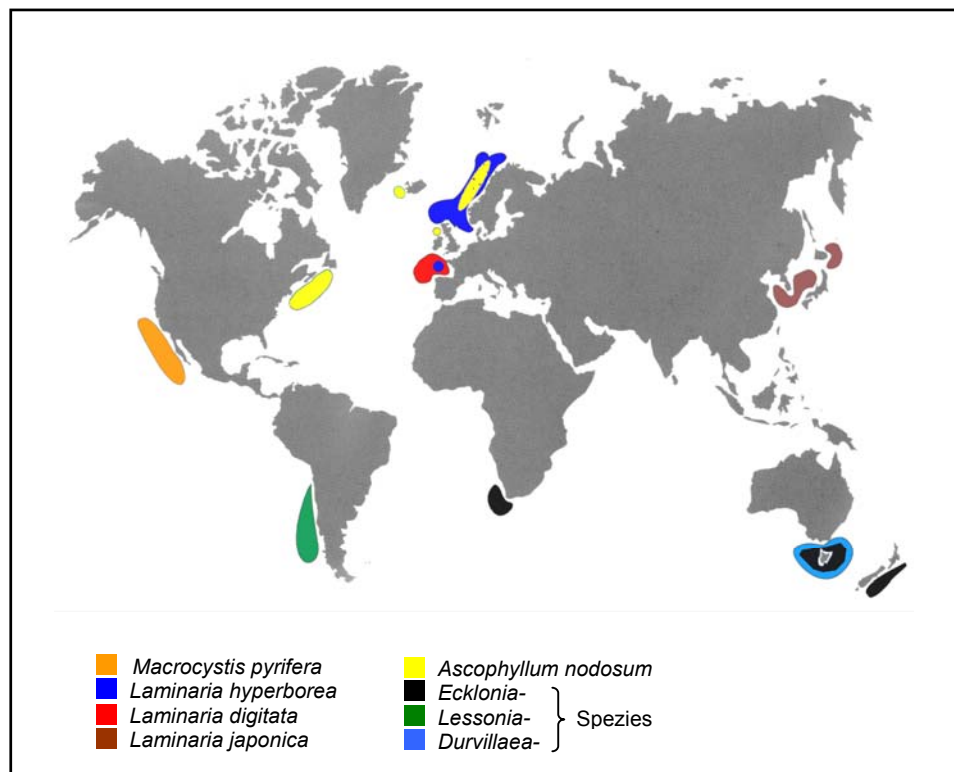


Abb. 14: Vorkommen der Braunalgen-Arten, die für die industrielle Alginat-Gewinnung verwandt werden (Firma Pronova Biopolymer, S. 3; verändert).

Die Ernte vieler für die Alginat-Produktion relevanter Phaeophyta geht heutzutage maschinell vonstatten (Furia 1972, S. 123; Kirst/Kremer 1983, S. 29, 32): So werden beispielsweise die im Bereich der Pazifikküste Kaliforniens lokalisierten Felder der Braunalge *Macrocystis pyrifera*, die man angesichts ihrer Länge von bis zu 50 Metern auch als Riesentang (engl. „giant kelp“) bezeichnet, vollautomatisch mit Hilfe von Spezialschiffen (engl. „kelp harvesters“) abgeerntet, die wie „Unterwasser-Mähmaschinen“ funktionieren (vgl. Abbildung 15 a)).

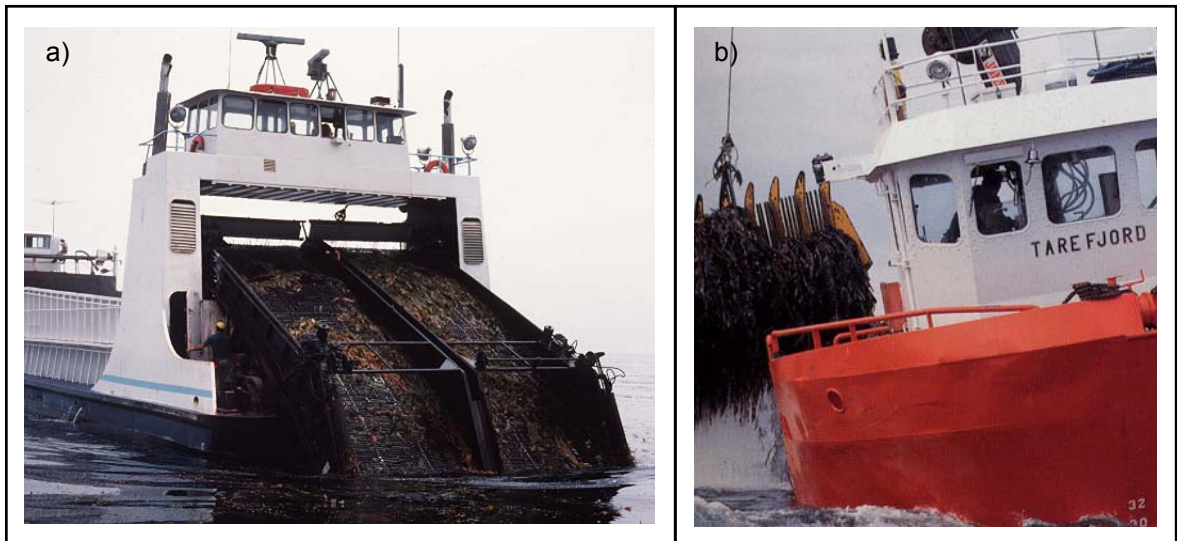


Abb. 15: Spezialschiffe für die Ernte alginathaltiger Braunalgen (UBC 2003): a) *Macrocystis pyrifera* (Kalifornien), b) *Laminaria hyperborea* (Norwegen) (Firma Pronova Biopolymer, S. 2).

Auch die für die europäische Alginat-Produktion verwandten Braunalgen werden vollautomatisch geerntet. In Norwegen erfolgt z. B. der Zugriff auf ausgedehnte Vorkommen von *Laminaria hyperborea* unter Einsatz speziell entwickelter Trawler (vgl. Abbildung 15 b)), mit welchen die Algen in Wassertiefen von 2 – 15 Metern gekappt werden (Firma Pronova Biopolymer, S. 2).

Bretonische Algenfischer hingegen verwenden für die *Laminaria*-Ernte Spezialboote, die mit einem so genannten „scoubidou“ ausgerüstet sind (vgl. Abbildung 16).

Dabei handelt es sich um ein rotierendes Gestänge, in welchem sich die Algen wie in einem Quirl verfangen und dann hydraulisch an Bord gebracht werden (Overath/Luider 1994, S. 82 f., 87).



Abb. 16: *Laminaria*-Ernte mit dem „scoubidou“ in der Bretagne (Overath/Luider 1994, S. 83).

Für die Alginat-Gewinnung genutzte Braunalgen-Arten, die im Bereich schlecht zugänglicher Felsküsten beheimatet sind, müssen allerdings auch heutzutage noch halbmechanisch von Booten aus geerntet werden. Dies ist z. B. bei der Ernte von *Ascophyllum nodosum* in Schottland und Irland der Fall (Briand 1991, S. 266).

Von Bedeutung für die Alginat-Produktion sind des Weiteren Vorkommen von Phaeophyta in der Gezeitenzone, die bei Ebbe trocken fallen und dann von Pflückern manuell abgeschnitten werden können (Voragen/Pilnik 1994, S. 36).

Auch das Sammeln mit der Flut angespülter Pflanzen spielt immer noch eine nicht zu unterschätzende Rolle: So werden in Irland für die industrielle Alginat-Gewinnung jährlich etwa 9.500 Tonnen Braunalgen der Spezies *Laminaria hyperborea* nach Frühlingsstürmen an Stränden im County Clare aufgelesen. Auch französische Alginat-Hersteller greifen auf Rohstoffressourcen der genannten Alge zurück, die auf diese Weise in einer Größenordnung von ca. 490 Jahrestonnen an den Küsten der Bretagne im Département Finistère anfallen (Briand 1991, S. 275).

Abbildung 17 zeigt Braunalgen der Gattung *Laminaria*, die an einem bretonischen Strand bei stürmischer Wetterlage angespült wurden.

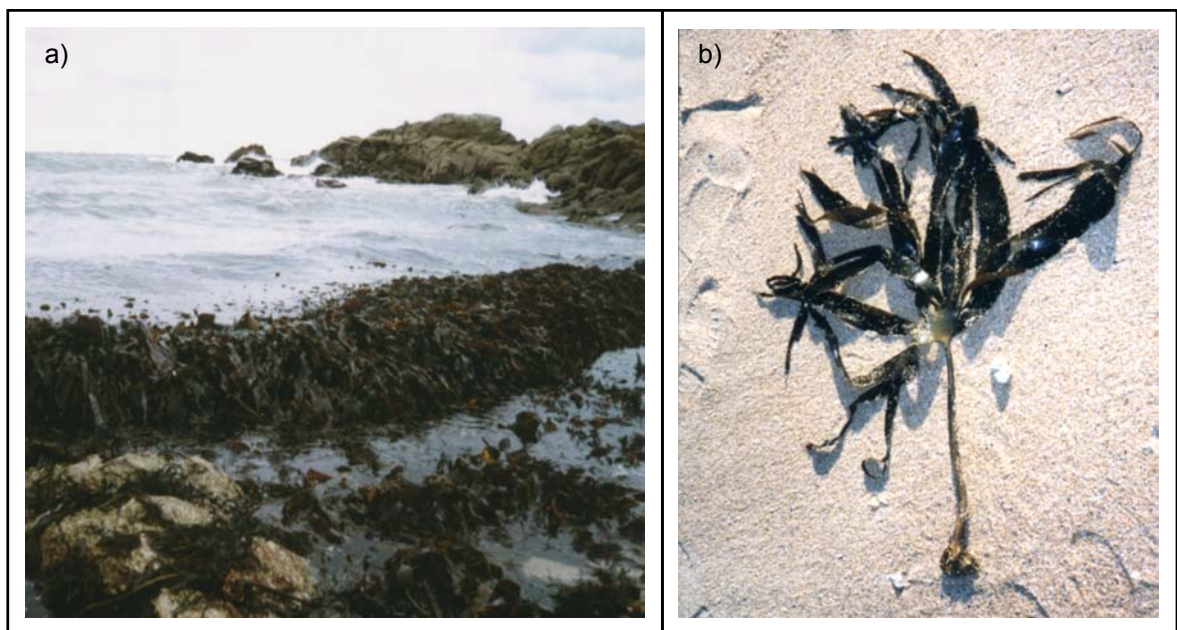


Abb. 17: Für die Alginat-Gewinnung relevante Phaeophyta (Bretagne, Frankreich): a) im Küstenbereich nach Sturm angespülte Braunalgen der Gattung *Laminaria*, b) etwa 1,10 m langes Exemplar der Spezies *Laminaria digitata* (eigene Aufnahmen).

2.4.2 Großtechnisches Produktionsverfahren

Für das Verständnis des Prinzips der industriellen Gewinnung von Alginat aus Braunalgen ist es zunächst notwendig, diejenigen Inhaltsstoffe näher zu betrachten, die im nativen Zustand neben den Polyuronaten vorliegen und von denen das Algenpolysaccharid im Laufe des Produktionsprozesses abgetrennt werden muss.

Im frischen Zustand enthalten Braunalgen zwischen 75 und 90 % Wasser. Nach Trocknen der Pflanzen findet man die in Tabelle 3 zusammengestellten anorganischen und organischen Komponenten in den jeweils angegebenen durchschnittlichen Massenanteilen vor:

Tab. 3: Wichtige Inhaltsstoffe der Braunalgen (Lüning 1985, S. 266, 282 – 284).

Komponenten	Massengehalt in %
<u>Anorganisch:</u> Mineralische Asche	bis 25
<u>Organisch:</u> Alginat weitere Strukturpolysaccharide (Cellulose, Fucoidan) Reservestoffe (Laminaran, D-Mannit) Proteine Photosynthesefarbstoffe ^a Polyphenole	15 – 40 Rest

^a Die Chloroplasten der Braunalgen enthalten Chlorophyll a, c₁ und c₂. Als akzessorisches Pigment kommt Fucoxanthin vor, das die braune Farbe der Phaeophyta verursacht. Außerdem findet man verschiedene Kombinationen weiterer Xanthophylle sowie β -Carotin (van den Hoek/Jahns/Mann 1993, S. 135).

Neben mineralischer Asche stellt Alginat mit einem Anteil von 15 – 40 % der Trockenmasse einen der Hauptinhaltsstoffe der Phaeophyta dar (Lüning 1985, S. 284).

Neben dem Polyuronat und Cellulose kommt in den Zellwänden von Braunalgen noch Fucoidan als Strukturkomponente vor. Dabei handelt es sich um ein verzweigtes Heteropolysaccharid, das vorwiegend aus α -1,2-glykosidisch verknüpfter sulfatierter L-Fucose besteht. Als weitere monomere Bausteine enthält Fucoidan die Hexosen D-Galactose und D-Mannose, die Pentose D-Xylose sowie die Zuckersäure D-Glucuronsäure (Falbe/Regitz 1995 b, S. 1452 f.; Lüning 1985, S. 284).

Außerdem finden sich in Braunalgen so genannte Reservestoffe. Diese Substanzen werden von den Pflanzen intrazellulär abgelagert und bei Nahrungsmangel wieder in den Stoff- und Energiewechsel eingeschleust (Falbe/Regitz 1995 e, S. 3847). Als wichtigsten Reservestoff bilden Braunalgen das Polysaccharid Laminaran, das ein lineares Glucan mit β -1,3- und einzelnen β -1,6-glykosidischen Bindungen darstellt (Falbe/Regitz 1995 c, S. 2439; van den Hoek/Jahns/Mann 1993, S. 135). Daneben kommt als frühes Photosyntheseprodukt der Zuckeralkohol D-Mannit vor (Falbe/Regitz 1995 d, S. 2633; Lüning 1985, S. 283).

Als weitere Bestandteile der Braunalgen sind Proteine zu nennen, die bei derben Seetangen, wie z. B. Arten der Gattung *Laminaria*, bis zu 10 % der organischen Trockenmasse ausmachen können (Lüning 1985, S. 283).

Außerdem enthalten die Wasserpflanzen Photosynthesefarbstoffe und Polyphenole. Letztere dienen den Algen zum Schutz vor Tierfraß (van den Hoek/Jahns/Mann 1993, S. 14; Lüning 1985, S. 266).

Um das Alginat möglichst vollständig von allen anderen Bestandteilen der Braunalgen abtrennen zu können, macht man sich bei der großtechnischen Gewinnung des Polysaccharid-Derivats vor allem zwei seiner charakteristischen Eigenschaften zunutze:

- die Wasserlöslichkeit von Natriumalginat sowie
- die charakteristische Gelbildungsfähigkeit der Alginat-Polyanionen mit Calcium-Ionen und mit Säure.

Prozesstechnische Details sind patentrechtlich geschützt, aber die meisten Hersteller arbeiten nach Methoden, die sich in ihren Grundzügen an den von Green (1934) und Le Gloahec/Herter (1938) entwickelten Verfahren orientieren (King 1983, S. 123; Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 213).

In der Regel gewinnt man zunächst Alginsäure, die dann zu Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- und Calciumalginaten sowie organischen Derivaten weiterverarbeitet wird. Die wichtigsten Schritte des großtechnischen Verfahrens werden in Abbildung 18 in Form eines Flussdiagramms zusammengefasst und sollen im Folgenden näher erläutert werden:

Aufbereitung der geernteten Algen

Als Ausgangsmaterial für die industrielle Alginat-Gewinnung werden traditionell getrocknete, gemahlene und durch Waschen mit Wasser gereinigte Braunalgen verwandt (Jensen 1995, S. 87; Voragen/Pilnik 1994, S. 37). Alginatproduzierende Firmen gehen jedoch vermehrt dazu über, den mit hohem Kostenaufwand verbundenen Trocknungsprozess zu umgehen und stattdessen Phaeophyta in frischer Form einzusetzen. Da Braunalgen jedoch außerhalb ihres natürlichen Lebensraumes binnen 48 Stunden verderben, müssen sie zum Zwecke der Stabilisierung zunächst mit einem Gemisch aus Mineralsäuren, Formalin und Konservierungsstoffen behandelt werden (Jensen 1995, S. 87; Overath/Luider 1994, S. 88).

Der zugesetzte Formaldehyd dient dabei nicht nur der Verlängerung der Haltbarkeit, sondern bildet vermutlich mit den polyphenolischen Bestandteilen der Algen harzartige, wasserunlösliche Produkte (Falbe/Regitz 1995 b, S. 1425; Falbe/Regitz 1995 d, S. 3351 ff.). Auf diese Weise wird verhindert, dass lösliche Polyphenole im Laufe des Gewinnungsprozesses unerwünschte Verfärbungen des zu isolierenden Polysaccharid-Derivats bewirken (Jensen 1995, S. 87).

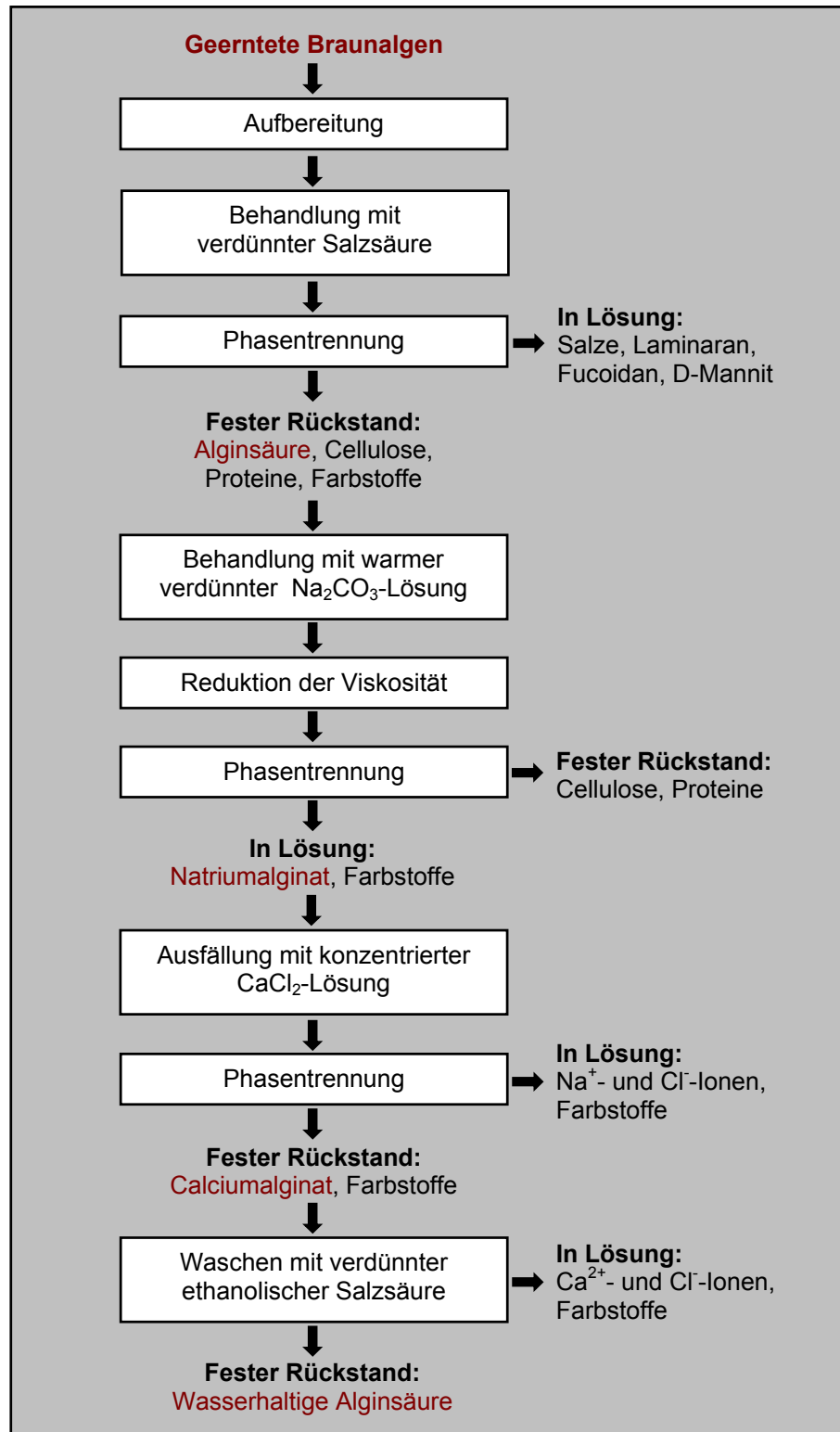
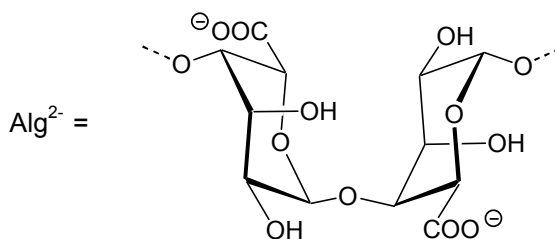
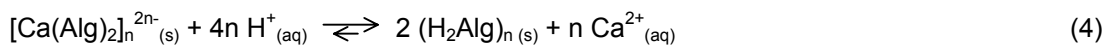


Abb. 18: Prinzip der großtechnischen Gewinnung von Alginsäure aus Braunalgen (Jensen 1995, S. 87; Sime 1990, S. 56; Voragen/Pilnik 1994, S. 37; Whyte 1988, S. 170; verändert).

Säurebehandlung

Die aufbereiteten getrockneten oder frischen Braunalgen unterzieht man im nächsten Produktionsschritt einer Behandlung mit einem Überschuss an verdünnter Salzsäure. Dies hat zur Folge, dass die im nativen Zustand hauptsächlich in Form löslicher Na^+ -, K^+ - und Mg^{2+} -Salze bzw. unlöslicher Ca^{2+} -, Sr^{2+} -, und Ba^{2+} -Verbindungen vorliegenden Alginate durch Kationenaustausch vollständig in Alginsäure überführt werden (Jensen 1995, S. 87; Whyte 1988, S. 170). Die folgende Reaktionsgleichung verdeutlicht den beschriebenen Vorgang schematisch am Beispiel der Umsetzung von Calciumalginate zu Alginsäure:

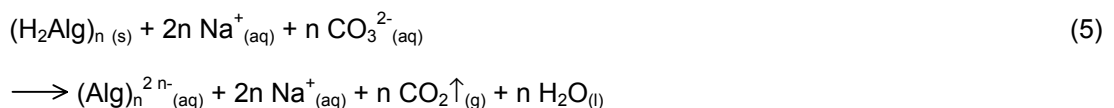


Bei der sich anschließenden Phasentrennung (z. B. durch Filtration) verbleibt ein fester Rückstand, der neben wasserunlöslicher Alginsäure vor allem Cellulose, Proteine und Farbstoffe enthält.

Mit der Salzsäure entfernt werden hingegen lösliche Inhaltsstoffe der Phaeophyta. Dabei handelt es sich neben den durch Ionenaustausch freigesetzten Kationen um die Polysaccharide Laminaran und Fucoidan, den Zuckeralkohol D-Mannit sowie weitere niedermolekulare Substanzen, wie beispielsweise Mono- und Oligosaccharide und Aminosäuren (Jensen 1995, S. 85, 87; Whyte 1988, S. 170).

Behandlung mit warmer verdünnter Natriumcarbonat-Lösung

Der erhaltene feste Rückstand wird anschließend in der Wärme mit verdünnter Natriumcarbonat-Lösung behandelt. Dabei wird die Alginsäure, wie in Gleichung (5) dargestellt, in einer Säure-Base-Reaktion zu wasserlöslichem Natriumalginate umgesetzt:

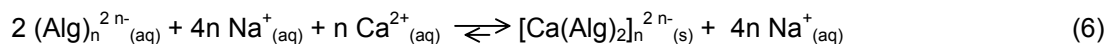


Das bei dem alkalischen Aufschluss entstehende Natriumalginate geht aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit zusammen mit den Photosynthesefarbstoffen in Lösung, während Cellulose und Proteine als unlöslicher Rückstand zurückbleiben (Jensen 1995, S. 87; Whyte 1988, S. 170).

Da native Alginat in der Regel über große Molmassen verfügen, ist das bei der Extraktion erhaltene Polysaccharid-Sol hochviskos und lässt sich somit technisch nur schwer handhaben. Um den aus Cellulose und Proteinen bestehenden festen Algen-Rückstand besser abtrennen zu können, führt man daher in der Industrie zur Reduktion der Viskosität zunächst eine partielle Depolymerisation des Alginats unter kontrollierten Bedingungen durch oder verdünnt das Natriumalginat-Sol mit Wasser (Jensen 1995, S. 87; Voragen/Pilnik 1994, S. 37). Die sich anschließende Phasentrennung wird großtechnisch auf unterschiedliche Weise vollzogen, z. B. durch Zentrifugieren, Filtration oder Flotation (Jensen 1995, S. 87; Voragen/ Pilnik 1994, S. 37).

Ausfällung von Calciumalginat

Zur weiteren Aufbereitung wird das erhaltene Natriumalginat-Sol zunächst unter Rühren in konzentrierte Calciumchlorid-Lösung eingebracht. Dabei fällt das Alginat gemäß Reaktionsgleichung (6) in Form eines unlöslichen Gels aus, während die Photosynthesefarbstoffe weitgehend in Lösung bleiben (Voragen/Pilnik 1994, S. 37).



Umwandlung von Calciumalginat in Alginsäure

Der durch Phasentrennung (z. B. Zentrifugieren) von dem farbstoffhaltigen Fällungsbad abgetrennte Calciumalginat-Niederschlag wird anschließend in einen Filter überführt und mit verdünnter ethanolischer Salzsäure-Lösung gewaschen (Whyte 1988, S. 171). Bei diesem Vorgang findet in Analogie zu Reaktion (4) eine Umwandlung des Calciumalginats in Alginsäure statt. Zugleich werden am Calciumalginat-Präzipitat anhaftende Reste von Photosynthesefarbstoffen mit der zum Waschen verwandten Lösung entfernt (Whyte 1988, S. 171).

Durch den Ethanol-Gehalt der eingesetzten verdünnten Salzsäure-Lösung versucht man außerdem zu verhindern, dass im Calciumalginat-Gel eventuell noch vorhandene Rückstände von nicht vollständig nach Gleichung (6) umgesetztem Natriumalginat bei der umwandlung in Alginsäure ausgewaschen werden. Kolloidal gelöstes Natriumalginat lässt sich nämlich mit relativ konzentrierten Alkoholen, die selbst Mischbarkeit mit Wasser aufweisen, aus einem Hydrosol ausfällen (Voragen/ Pilnik 1994, S. 38).

Dieser Vorgang hat folgenden physikalisch-chemischen Hintergrund: Als hydrophile Kolloide stabilisieren sich Alginat-Polyanionen in Lösung vor allem durch Umhüllung mit Wasser-Molekülen. Bei Zusatz von Ethanol wird diese Wasser-Hülle dadurch geschwächt, dass ihr im Zuge der Hydratation des Alkohols Lösungsmittel-Moleküle entzogen werden. Dies hat zur Folge, dass das Natriumalginat in Form eines unlöslichen Präzipitats ausfällt.

Bleichung

Um auch optisch ansprechende Erzeugnisse zu erhalten, bleicht man in der Industrie häufig noch das nach Abtrennung von Cellulose und Proteinen erhaltene Natriumalginat-Sol oder den im nächsten Produktionsschritt erzeugten Calciumalginat-Niederschlag durch Reaktion mit Hypochlorit. Auf diese Weise werden die in den Braunalgen vorliegenden Polyphenole und Photosynthesefarbstoffe oxidativ zerstört und können somit keine unerwünschten Verfärbungen der Alginsäure hervorrufen (Jensen 1995, S. 88; Voragen/Pilnik 1994, S. 37).

Weiterverarbeitung der hergestellten Alginsäure

Die als Produkt anfallende wasserhaltige Alginsäure kann auf unterschiedliche Weise weiterverarbeitet werden (vgl. Abbildung 19):

Ein Großteil der noch wasserhaltigen Polyuronsäure wird mit Alkalimetall-, Ammonium- oder Erdalkalimetallcarbonaten zu Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- und Calciumalginaten umgesetzt. Am Beispiel der Reaktion von Alginsäure mit Natriumcarbonat wurde dieser Vorgang bereits in Gleichung (5) beschrieben.

Nach schonendem Trocknen und Vermahlen kommen die auf diese Weise hergestellten Alginatpulver in pulverisierter Form in den Handel (vgl. z. B. Firma Pronova Biopolymer, S. 4; Firma Systems Bio-Industries 1987, S. 25; Sime 1990, S. 56).

Des Weiteren dient wasserhaltige Alginsäure als Edukt für die Synthese von organischen Derivaten, wie z. B. dem Ester Propylenglykolalginat (PGA) (vgl. Kapitel 2.5 des Theoretischen Teils).

Schließlich wird auch ein Teil der industriell gewonnenen Alginsäure durch Trommel-, Sprüh- oder Vakuumtrocknung weitgehend von Wasser befreit und als Reinsubstanz in gemahlener Form verkauft (Jensen 1995, S. 88).

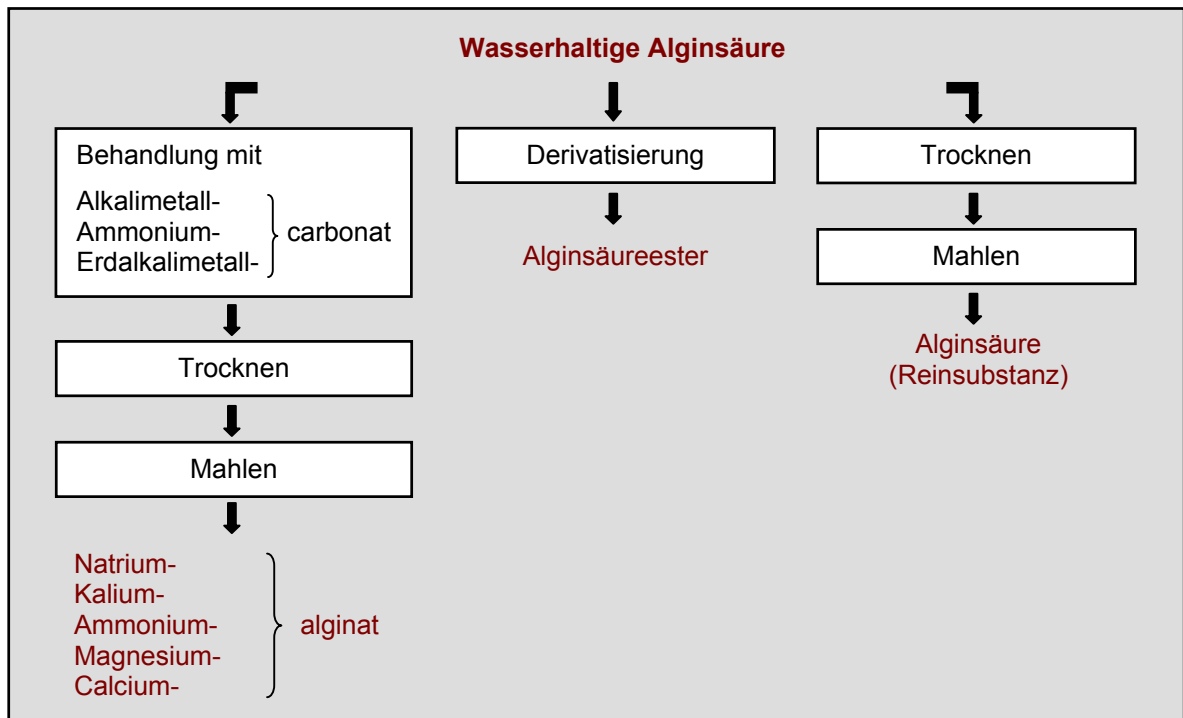


Abb. 19: Industrielle Weiterverarbeitung wasserhaltiger Alginsäure (Firma Pronova Biopolymer, S. 5; verändert).

2.4.3 Labormethoden zur Isolierung von Alginat

2.4.3.1 Gewinnung von Alginsäure aus *Laminaria*-Spezies

Vorgehensweise

In Experiment 7 a) wird eine Methode vorgestellt, mit der sich unter Laborbedingungen Alginsäure aus Braunalgen gewinnen lässt. Bei der Entwicklung des Versuchs erfolgte eine grundsätzliche Orientierung an den von Percival/McDowell (1990, S. 532 f.) und Whyte (1988, S. 168 – 173) beschriebenen Extraktionsverfahren. Es wurden aber entscheidende experimentelle Veränderungen vorgenommen, um die Verwendung von Chemikalien mit hohem Gefahrenpotential zu vermeiden und den gerätetechnischen und zeitlichen Aufwand zu reduzieren.

Im Unterschied zum modernen großtechnischen Produktionsprozess werden in Experiment 7 a) als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Alginsäure keine frischen, sondern getrocknete Braunalgen, wie z. B. *Laminaria digitata* (Bretagne) und *Laminaria hyperborea* (Helgoland), eingesetzt. Dies liegt darin begründet, dass sich die selbst gesammelten Algen am einfachsten durch Trocknen an der Sonne konservieren lassen.

Die von Percival/McDowell (1990, S. 532) auch für Phaeophyta im Trockenzustand vorgeschlagene Behandlung mit Formaldehyd-Lösung ($w = 40 \%$) wird in Experiment 7 a) vermieden, da es sich bei Methanal um eine Substanz mit potentiell carcinogener Wirkung handelt (Falbe/Regitz 1995 b, S. 1424).

Die Gewinnung von Alginsäure erfolgt in Experiment 7 a) nach dem im Folgenden dargestellten Prinzip:

Die gemahlene Braunalge wird zunächst zweimal 30 Minuten mit kalter verdünnter Salzsäure behandelt. Um eine Depolymerisation des Alginats zu verhindern, unterbleibt im vorliegenden Versuch das von Whyte (1988, S. 169) praktizierte Erhitzen des stark sauren Reaktionsgemisches.

Alle in Abbildung 18 beschriebenen Phasentrennungsoperationen werden in Experiment 7 a) durch Absaugen über Büchnertrichter ausgeführt, die mit mittelweitporigem Filterpapier oder mit feinem Nesselstoff als Filtriergewebe ausgelegt sind. Dadurch lässt sich das nach der Methode von Whyte (1988, S. 169 – 171) zu diesem Zweck erforderliche Zentrifugieren im präparativen Maßstab, für welches in vielen Laboratorien die Ausstattung fehlt, gänzlich umgehen.

Der durch Filtration der Braunalge-Salzsäure-Mischung erhaltene feste Algenrückstand wird anschließend – wie im industriellen Prozess – einer Heißextraktion mit verdünnter Na_2CO_3 -Lösung unterzogen. Da die Soda-Lösung bereits vor Zugabe des Rückstandes auf die gewünschte Temperatur erwärmt wird, hat sich eine Reaktionszeit von 15 Minuten als völlig ausreichend erwiesen. Dadurch ergibt sich gegenüber der von Percival/McDowell (1990, S. 532) beschriebenen Methode, in welcher ein dreistündiger alkalischer Aufschluss durchgeführt wird, eine beträchtliche Verkürzung des mit diesem Schritt verbundenen zeitlichen Aufwandes.

Die Viskosität des resultierenden Natriumalginat-Sols wird in Experiment 7 a) durch Verdünnen mit entionisiertem Wasser reduziert, da diese Vorgehensweise unter Laborbedingungen einfacher zu realisieren ist als eine kontrollierte Depolymerisation des Algenpolysaccharids. Die im Sol vorliegenden festen Cellulose- und Protein-Rückstände lassen sich daraufhin leicht durch Absaugen über Filtriergewebe abtrennen.

In Analogie zum großtechnischen Prozess bringt man das als Filtrat erhaltene Natriumalginat-Sol unter Rühren in konzentrierte Calciumchlorid-Lösung ein. Das dabei als Präzipitat anfallende Calciumalginat-Gel wird in einen Filter überführt und so lange mit verdünnter ethanolischer Salzsäure behandelt, bis in der mit konzentrierter Ammoniak-Lösung abgestumpften Waschflüssigkeit bei Versetzen mit $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,04$) keine Calcium-Ionen mehr nachweisbar sind.

Die als Reaktionsprodukt anfallende noch stark wasserhaltige Alginsäure wird durch Waschen mit Ethanol (1 : 1) von anhaftenden Mineralsäureresten befreit und im Anschluss daran durch Behandlung mit konzentriertem Ethanol und Aceton partiell dehydratisiert. Nach Trocknen im Vakuumexsikkator bis zur Massenkonstanz erhält man ein faseriges Produkt, das sich durch Mahlen zerkleinern lässt.

Abbildung 20 zeigt das Ausgangsmaterial und das Produkt des in Experiment 7 a) beschriebenen Verfahrens zur Gewinnung von Alginsäure aus Braunalgen:

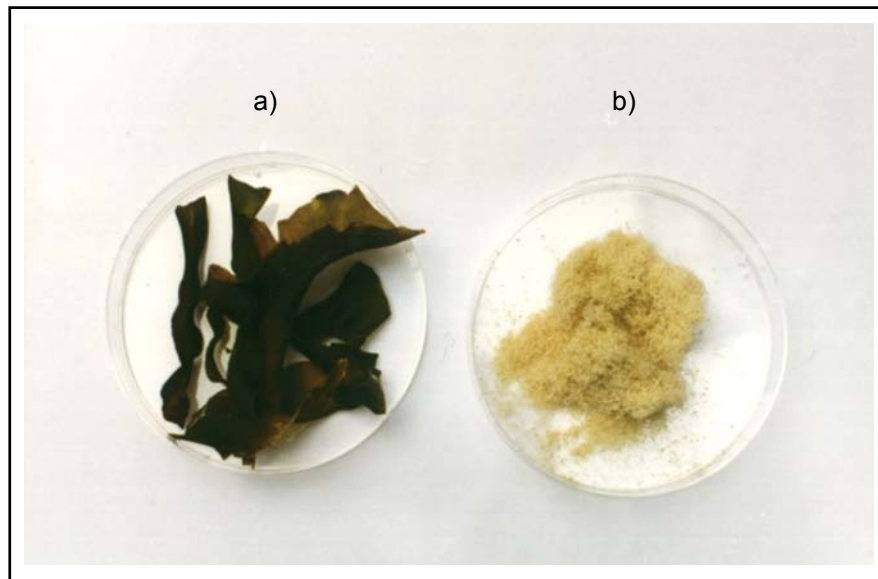


Abb. 20: Gewinnung von Alginsäure aus *Laminaria*-Spezies (Experiment 7 a): a) als Ausgangsmaterial eingesetzte getrocknete *Laminaria digitata* (5 g), b) daraus erhaltene vakuumgetrocknete, zerkleinerte Alginsäure-Fasern (1,07 g).

Bestimmung des Reinheitsgrades

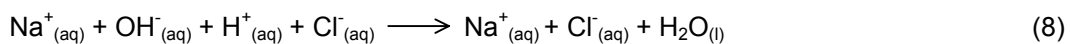
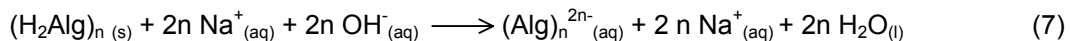
Nach der in Experiment 7 a) beschriebenen Methode wurden z. B. aus 5 g getrockneten *Laminaria digitata* (Bretagne) 1,07 g Alginsäure gewonnen.

Die Abschätzung der Ausbeute durch Ermittlung des Massenanteils und Vergleich mit dem Literaturwert erscheint aus folgendem Grunde allerdings wenig sinnvoll: Zwar ist bekannt, dass Braunalgen im Durchschnitt zwischen 15 und 40 % Alginat enthalten (Lüning 1985, S. 284), aber diese Angabe bezieht sich auf das im nativen Zustand vorliegende gemischte Alkali- und Erdalkalimetallsalz. Da man die genaue Zusammensetzung dieses Gemisches für die als Ausgangsmaterial eingesetzten Algen jedoch nicht kennt, würde ein durch Umrechnung über die Molmassen der Alginsäure und der Alginatsalze ermittelter Massengehalt immer nur einen Überschlagswert darstellen.

Um die Güte des im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Gewinnungsverfahrens einschätzen zu können, wurde daher der Reinheitsgrad der erhaltenen Alginsäure nach der auf Whyte (1988, S. 171) zurückgehenden und in Experiment 8 a) beschriebenen Methode ermittelt:

Exakt 200 mg der getrockneten und gemahlene Alginsäure werden unter Rühren und mäßigem Erwärmen mit einem Überschuss an Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$, t) quantitativ zu Natriumalginat umgesetzt. Die in dem resultierenden Sol enthaltene nicht verbrauchte Natronlauge titriert man anschließend mit Salzsäure-Maßlösung ($c = 0,1 \text{ mol/L}$, t) unter Einsatz des Indikators Phenolphthalein zurück. Am Äquivalenzpunkt ist ein Farbumschlag von rotviolett nach farblos zu beobachten. Die Bestimmung wird in analoger Form mit einer zweiten Alginsäure-Probe wiederholt.

Mit der Ermittlung des Reinheitsgrades sind die folgenden Säure-Base-Reaktionen nach Brønsted verknüpft:



Aus den Titrationsergebnissen berechnet sich dann folgendermaßen der Reinheitsgrad:

Stoffmenge n der verbrauchten Hydroxid-Ionen in mol:

$$n (\text{OH}^-, \text{ verbraucht}) = n (\text{NaOH}_{(\text{aq})}, \text{ vorgelegt}) - n (\text{HCl}_{(\text{aq})}, \text{ verbraucht}) \quad (9)$$

$$n (\text{OH}^-, \text{ verbraucht}) = V \cdot c \cdot t (\text{NaOH}_{(\text{aq})}, \text{ vorgelegt}) - V \cdot c \cdot t (\text{HCl}_{(\text{aq})}, \text{ verbraucht}) \quad (9')$$

Titrimetrisch ermittelte Stoffmenge n der Alginsäure in mol:

$$n (\text{Alginsäure}, \text{ ermittelt}) = n (\text{OH}^-, \text{ verbraucht}) \quad (10)$$

Säuregehalt der Alginsäure (= Reinheitsgrad in %):

$$\text{Reinheitsgrad} = \frac{n (\text{Alginsäure}, \text{ ermittelt}) \cdot M (\text{Alginsäure}, \text{ empirisch}) \cdot 100 \%}{m (\text{Alginsäure}, \text{ eingewogen})} \quad (11)$$

$$\text{Reinheitsgrad} = \frac{n (\text{Alginsäure}, \text{ ermittelt}) \cdot 194 \text{ g/mol} \cdot 100 \%}{m (\text{Alginsäure}, \text{ eingewogen})} \quad (11')$$

Bei der Berechnung wird berücksichtigt, dass im Vakuum bis zur Massenkonstanz getrocknete Alginsäure immer noch partiell wasserhaltig ist. So findet man experimentell auch im Falle industriell hergestellter Alginsäure für die Monomer-Reste (G bzw. M) nicht die theoretisch zu erwartende Molmasse von $176,13 \text{ g/mol}$, sondern einen durch gebundenes Restwasser erhöhten Wert von etwa 194 g/mol (Haug 1964 b; zitiert in Firma Kelco 1987, S. 5).

Für die aus 5 g getrockneten *Laminaria digitata* hergestellten 1,07 g Alginsäure ergab sich unter Anwendung der beschriebenen Bestimmungsmethode ein Reinheitsgrad von 98,1 % (gemittelt aus zwei Titrationsergebnissen).

2.4.3.2 Gewinnung von Alginsäure aus *Fucus vesiculosus*

Problemstellung

Bei dem Versuch, die vorstehend diskutierte Labormethode zur Gewinnung von Alginsäure aus *Laminaria*-Arten auf die in Deutschland heimische Braunalge *Fucus vesiculosus* zu übertragen (Claußen/Marburger 2001, S. 34), erhält man sehr geringe Ausbeuten eines noch stark verunreinigten, durch Reste von Polyphenolen und Photosynthesefarbstoffen braun gefärbten Produktes (vgl. Abbildung 23 b)).

Um die genannte Spezies trotzdem als Ausgangsmaterial für die Extraktion reiner Alginsäure nutzen zu können, ist daher eine Modifizierung von Teilschritten des in Experiment 7 a) beschriebenen Gewinnungsverfahrens erforderlich (Claußen/Marburger 2001, S. 34 – 45).

Lösungsansätze

Für die Variation der Ausgangsvorschrift gibt es mehrere sinnvolle Ansatzpunkte (vgl. Abbildung 21):

Variation 1: Geringere Verdünnung des Natriumalginat-Sols

Bei Verwendung von *Fucus vesiculosus* als Rohstoff für die Alginsäure-Gewinnung erhält man nach der Säurebehandlung und dem Aufschluss der Braunalgen mit erwärmter Soda-Lösung ein stark gefärbtes Natriumalginat-Sol. Wie Versuchsreihen gezeigt haben, ist die Ausgangskonzentration an Algenpolysaccharid in der aus der Nordsee stammenden Braunalge deutlich niedriger ist als in den vorher eingesetzten *Laminaria*-Arten. Daher wird in diesem Arbeitsschritt nicht mehr auf 1000 mL verdünnt, sondern nur noch auf ein Gesamtvolumen von 500 mL mit entionisiertem Wasser aufgefüllt, um eine Fällbarkeit des Algenpolysaccharids als Calciumalginat-Gel zu gewährleisten.

Variation 2: Zusätzliche Reinigung mit Adsorbentien

Da die Ausfällung mit Calciumchlorid-Lösung für die vollständige Entfernung von Polyphenolen und Photosynthesefarbstoffen offensichtlich nicht ausreicht, empfiehlt es sich, vor Durchführung dieser Operation einen zusätzlichen Reinigungsschritt durch Behandlung der Algenpolysaccharid-Lösung mit verschiedenen Adsorbentien einzuführen.

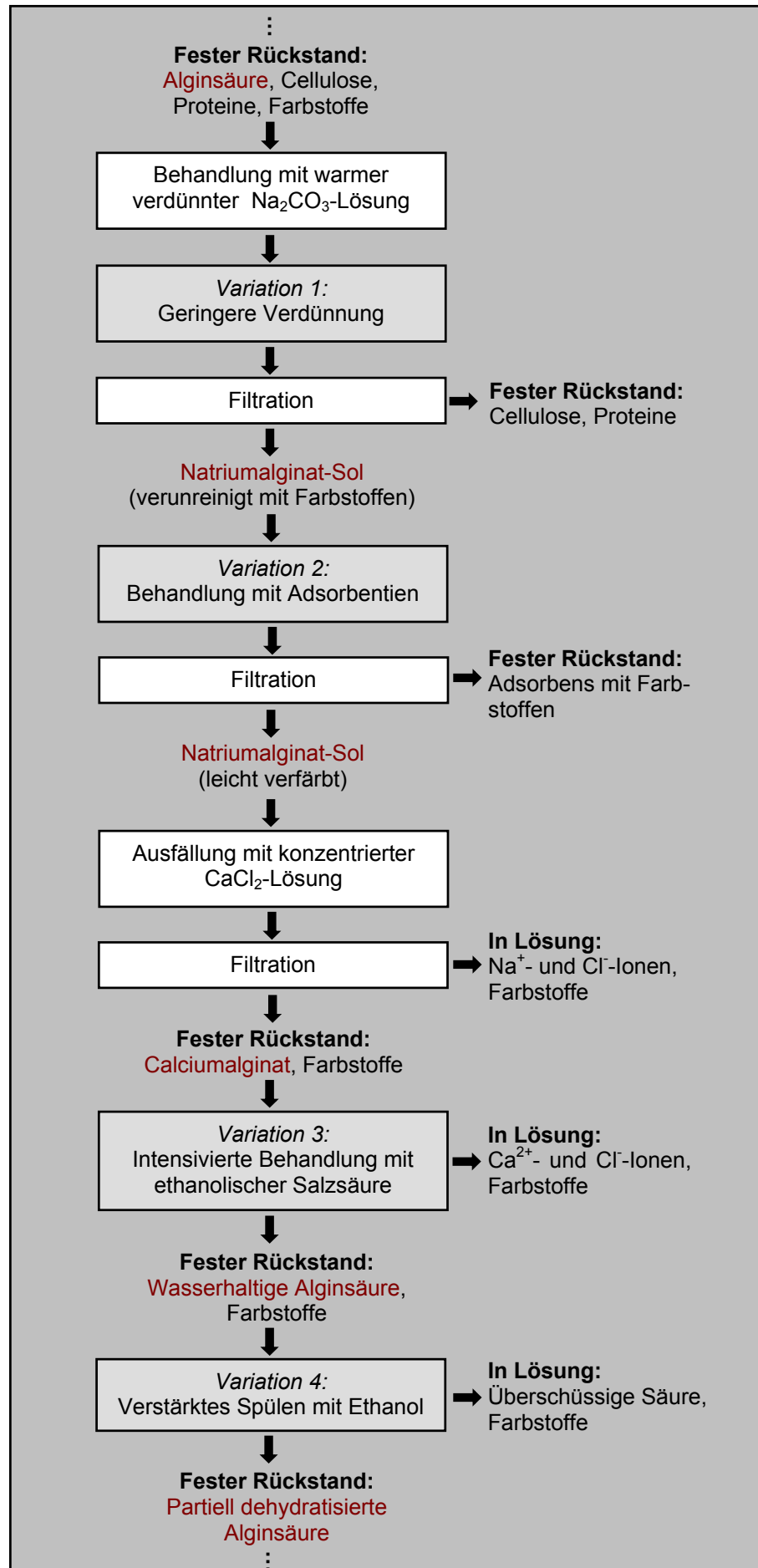


Abb. 21: Ansatzpunkte für Variationen von Experiment 7 a), um die Arbeitsvorschrift brauchbar für die Gewinnung von reiner Alginsäure aus *Fucus vesiculosus* zu machen.

Variation 3: Intensivierung der Behandlung mit ethanolischer Salzsäure

Eine weitere Möglichkeit der Modifizierung von Experiment 7 a) besteht darin, die zu Reinigungszwecken durchgeführte Behandlung von Calciumalginat mit ethanolischer Salzsäure zu intensivieren.

Variation 4: Verstärktes Spülen mit Ethanol

Schließlich ist es auch noch in Betracht zu ziehen, für das Spülen der wasserhaltigen Alginsäure größere Ethanol-Volumina einzusetzen. Da dieser Arbeitsschritt nicht nur dazu dient, die noch feuchten Fasern zu dehydratisieren, sondern auch das Ziel hat, sie von anhaftenden Farbstoff-Resten zu befreien, erscheint hier eine verstärkte Behandlung sinnvoll.

Experimentelle Ergebnisse**Zu Variation 2:**

Für die Entfärbung des mit Farbstoffen verunreinigten Natriumalginat-Sols (vgl. Abbildung 21) werden zunächst in Vortests verschiedene Adsorbentien eingesetzt:

Mit fein gepulverter und grob gekörnter Aktivkohle erzielt man zwar eine Aufhellung der Algenpolysaccharid-Lösung, aber bei der Abtrennung gelangen Partikel des Adsorbens in das Filtrat. Auch Kieselgur ist für die Behandlung des Sols ungeeignet, da sich Ansätze mit diesem Stoff nicht mehr filtrieren lassen.

Sowohl hinsichtlich ihrer Reinigungswirkung als auch in Bezug auf ihre leichte Abtrennbarkeit durch Filtration eignen sich aber die in Tabelle 4 aufgeführten Adsorbentien prinzipiell für die Entfärbung des Natriumalginat-Sols.

Tab. 4: Vorversuche zur Reinigung des farbstoffhaltigen Natriumalginat-Sols durch Adsorbentien (Claußen/Marburger 2001, S. 35).

Adsorbens	Probe Nr.	Temperatur $\vartheta/^\circ\text{C}$	Adsorbens m/g	Farbe des behandelten Sols
Polyamid-Pulver (Firma Roth)	1	45	2,0	heller als ohne Adsorbens
	2	45	2,5	heller als Probe 1
	3	45	3,0	heller als Probe 2
	4	70	3,0	wie Probe 3
Cellulose-Ionenaustauscher („DEAE SH“, Firma Serva)	5	25	1,5	heller als ohne Adsorbens
	6	25	2,0	heller als Probe 5
	7	25	2,5	heller als Probe 6
	8	25	3,0	heller als Probe 7 ^a
Cellulose für Dünnschicht- chromatographie („DS-0“, Firma Fluka)	9	25	2,0	wie ohne Adsorbens
	10	25	3,0	wie Probe 9
	11	25	5,0	leichte Aufhellung
	12	25	7,0	wie Probe 11

^a Bei Behandlung des Natriumalginat-Sols aus Probe 8 mit Calciumchlorid-Lösung erhält man ein fein verteiltes, schlecht filtrierbares Calciumalginat-Gel.

Für die in Tabelle 4 beschriebenen Untersuchungen versetzt man jeweils 50-mL-Proben der verunreinigten Algenpolysaccharid-Lösungen mit variierenden Adsorbens-Portionen. Die resultierende Mischung wird jeweils 30 Minuten bei der angegebenen Temperatur gerührt und gegebenenfalls auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Abtrennung des Adsorbens erfolgt durch Filtration über einen mittelweitporigen Filter.

Abbildung 22 verdeutlicht die Ergebnisse der Entfärbungstests mit verschiedenen Adsorbentien: Mit dem Cellulose-Ionenaustauscher (Firma Serva) werden die besten Reinigungseffekte erzielt. Größere Mengen als 2,5 g des Stoffes pro 50-mL-Probe zeigen zwar eine noch bessere Aufhellungswirkung (vgl. Tabelle 4), aber das so behandelte Sol liefert bei Ausfällung mit Calciumchlorid-Lösung ein sehr feines, schlecht durch Filtration abtrennbares Calciumalginat-Präzipitat.

Dies liegt vermutlich darin begründet, dass bei Verwendung zu großer Adsorbens-Portionen nicht nur die zu entfernenden Photosynthesefarbstoffe, sondern auch ein Teil der Algenpolysaccharid-Moleküle an der Cellulose adsorbiert werden. Das erhaltene Natriumalginat-Sol ist dann in seiner Konzentration reduziert, was die Ausfällung von Calciumalginat erschwert.

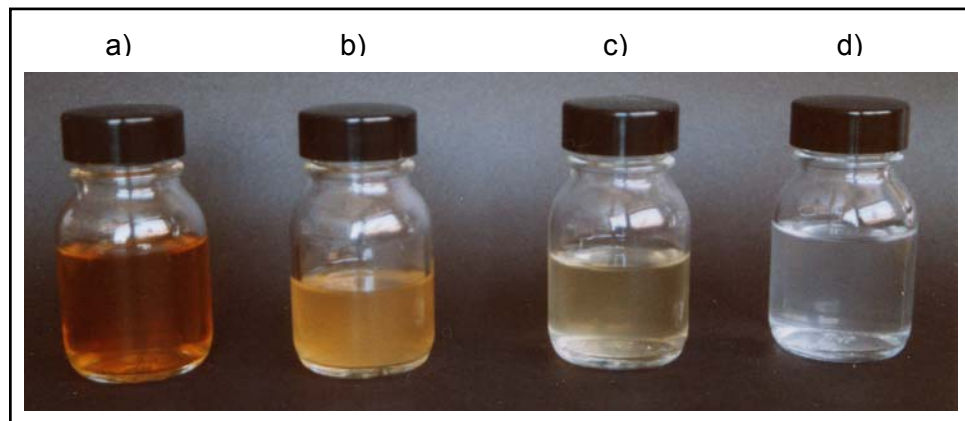


Abb. 22: Reinigung des bei Aufschluss von *Fucus vesiculosus* erhaltenen Natriumalginat-Sols durch Adsorbentien: a) Ausgangslösung, b) mit Polyamid (Probe 3), mit Cellulose für Dünnschichtchromatographie (Probe 11), c) mit Cellulose-Ionenaustauscher (Probe 7) entfärbtes Sol (zur Nummerierung der Proben vgl. Tabelle 4) (Claußen/Marburger 2001, S. 36).

Bei dem Versuch, die im kleinen Maßstab bewährte Reinigungsmethode mit Cellulose-Ionenaustauscher auf den Gesamtansatz des bei der Extraktion erhaltenen Natriumalginat-Sols zu übertragen (Verwendung von 25 g Adsorbens für 500 mL Gesamtvolumen), tritt allerdings ein Problem auf: Das resultierende Sol ist zwar stark aufgehellt, lässt sich aber durch Behandlung mit Calciumchlorid-Lösung nicht mehr in ein fällbares Calciumalginat-Gel überführen. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass auch ein Teil des gelösten Algenpolysaccharids adsorptiv an Cellulose gebunden wird.

Zur Umgehung dieser Schwierigkeit ist eine Erhöhung der Natriumalginat-Konzentration in dem zu behandelnden Sol erforderlich. Dazu wird die Arbeitsvorschrift für die Gewinnung von Alginsäure aus *Laminaria*-Arten dahingehend abgewandelt, dass man das nach Aufschluss mit Natriumcarbonat-Lösung und Abtrennung der festen Cellulose- und Protein-Rückstände erhaltene Natriumalginat-Sol vor der Behandlung mit Adsorbentien nicht mehr auf 500 mL, sondern auf geringere Gesamtvolumina (z. B. 300 bzw. 400 mL) verdünnt.

50-mL-Proben dieser stärker konzentrierten Natriumalginat-Sole werden dann Entfärbungsversuchen mittels Cellulose-Ionenaustauscher unterzogen und nach Abtrennung des Adsorbens auf ihre Fällbarkeit mit Calciumchlorid-Lösung untersucht.

Die Ergebnisse dieser Variationen sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Alle dort aufgeführten Natriumalginat-Sole können nach ihrer Reinigung durch Einbringen in 50 mL Calciumchlorid-Lösung ($w = 0,10$) in gut filtrierbare Calciumalginat-Gele umgewandelt werden.

Tab. 5: Variation der Konzentration der verunreinigten Natriumalginat-Sole vor Behandlung mit Cellulose-Ionenaustauscher und Ausfällung mit Calciumchlorid-Lösung ($w = 0,10$) (Claußen/Marburger 2001, S. 38).

Ansatz Nr.	Natriumalginat- Stammlösung V/mL	Eingesetztes Adsorbens		Einwirk- zeit ϑ /min	Sol-Farbe im Vergleich zu anderen Ansätzen
		Typ ^a	m/g		
1	300	1	2,0	30	dunkler als Probe 6 ^b
2	300	1	3,5	30	wie 1
3	300	1	3,0	30	wie 1
4	400	1	1,0	30	besser als 1
5	400	1	1,5	30	besser als 4
6	400	1	2,0	30	wie 5
7	300	1	0,5	15	schlechter als 1
8	300	2	0,5	30	wie 7
9	300	2	1,0	15	besser als 7
10	300	2	1,0	30	dunkler als 9
11	300	2	1,5	15	wie 10
12	300	2	2,0	15	wie 10
13	400	2	0,5	15	wie 9
14	400	2	0,75	15	besser als 13
15	300	2	2 x 0,5 ^c	15	besser als 9
16	400	2	2 x 0,25 ^c	15	wie 9
17	400	2	2 x 0,375 ^c	15	besser als 15

^a Typ 1: Cellulose-Ionenaustauscher „DEAE SH“ (Firma Serva); da dieses Erzeugnis im Handel nicht mehr erhältlich ist, wird ein vergleichbares Nachfolgeprodukt (Typ 2: „DEAE 23 SH“) eingesetzt.

^b Zur Nummerierung und Beschreibung der Probe vgl. Tabelle 4.

^c Die Behandlung mit dem Adsorbens wird zweimal in Folge durchgeführt.

Relativ gute Reinigungseffekte erzielt man mit den für die Ansätze 14 und 15 angegebenen Reaktionsbedingungen (vgl. graue Unterlegung in Tabelle 5). Das günstigste Ergebnis der Versuchsreihen liefert jedoch Ansatz 17: Hier wird eine 50-mL-Probe der auf 400 mL Gesamtvolumen verdünnten Natriumalginat-Stammlösung zweimal sukzessive mit 0,375 g Cellulose-Ionenaustauscher vom Typ 2 entfärbt.

Zu den Variationen 3 und 4:

Unter entsprechender Vergrößerung des Ansatzes überträgt man nun die optimierten Reinigungsbedingungen (vgl. Tabelle 5, Nr. 17 und 14) auf die Gesamtmenge an Algenpolysaccharid-Sol. Aus dem durch Cellulose-Behandlung teilweise entfärbten Natriumalginat-Sol kann dann gemäß der Arbeitsvorschrift in Experiment 7 a) Alginsäure gewonnen werden.

Um die für *Laminaria*-Spezies günstige Extraktionsmethode für *Fucus vesiculosus* als Ausgangsmaterial zu optimieren, werden zusätzlich noch folgende Modifikationen vorgenommen:

- Bei der Ausfällung des Calciumalginat-Gels erweist es sich als günstig, die entfärbte Natriumalginat-Lösung in 400 mL mit einem Glasstab gerührte Calciumchlorid-Lösung einzubringen. Das dabei erhaltene Produkt ist besser filtrierbar als wenn man – wie in der Originalvorschrift – 300 mL mittels Magnetrührer durchmischter Lösung einsetzt.
- Des Weiteren wird getestet, ob die Behandlung des abfiltrierten Calciumalginat-Gels mit Volumina an ethanolischer Salzsäure, die größer sind als die normalerweise verwandten 1000 mL, zu reineren Produkten führt (vgl. Abbildung 21, Variation 3).
- Abweichend von Experiment 7 a) wird die noch relativ stark verfärbte wasserhaltige Alginsäure nicht mit 200 mL, sondern mit 300 mL Ethanol gespült, da auf diese Weise eine bessere Entfernung der Farbstoffe möglich ist (s. Abbildung 21, Variation 4).

Die aus diesen Variationen resultierenden Ergebnisse werden in Tabelle 6 zusammengestellt. Die Ermittlung der in Spalte 7 angegebenen Säuregehalte (= Reinheitsgrade) erfolgt nach der Methode von Whyte (1988, S. 171). Da allerdings die Ausbeute an Alginsäure bei der Extraktion aus *Fucus vesiculosus* sehr gering ist, muss die Ansatzgröße für die Titration verkleinert werden, damit zwei Bestimmungen durchgeführt werden können (vgl. Experiment 8 b)).

Tab. 6: Ergebnisse der modifizierten Extraktion von Alginsäure aus *Fucus vesiculosus* einschließlich Reinigung der Gesamtmenge des Natriumalginat-Sols mit Cellulose-Ionenaustauscher (Claußen/Marburger 2001, S. 39 – 42) (vgl. Experimente 7 b) und 8 b)).

Ansatz Nr. ^a	Natriumalginat- Stammlösung V/mL	Adsor- bens m/g	Ethanol. Salzsäure V/mL	Extrahierte Alginsäure		Säure- gehalt ^b %
				m/g	Färbung	
17/1	400	2 x 3	1000	0,26	hellbeige	93,12
17/2	400	2 x 3	1000	0,22	dunkler als 14/3	94,58
17/3	400	2 x 3	1200	0,23	wie 17/1	84,88
17/4	400	2 x 3	1500	0,29	wie 17/1	87,79
14/1	400	3	1000	0,34	wie 17/1	86,32
14/2	400	3	1500	0,24	dunkler als 17/1	96,03
14/3	400	3	1700	0,32	dunkler als 17/1	86,82

^a Die Ziffer vor dem Schrägstrich entspricht der Nummer des Ansatzes aus Tabelle 5, dessen Reinigungsbedingungen auf die Gesamtmenge an Natriumalginat-Sol übertragen wurden.

^b Die Bestimmung des Säuregehaltes erfolgt gemäß der Vorschrift in Experiment 8 b). Der in der Tabelle angegebene Wert wurde jeweils aus den Ergebnissen zweier Titrationen gemittelt.

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist, lassen sich durch zwei aufeinander folgende Behandlungen von 400 mL verunreinigtem Natriumalginat-Sol mit jeweils 3 g Cellulose-Ionenaustauscher (Ansätze 17/1 – 17/4) insgesamt bessere Ergebnisse erzielen als bei einmaliger Entfärbung mit 3 g Adsorbens (Proben 14/1 – 14/3).

Die Intensivierung der Behandlung mit ethanolischer Salzsäure (Variation 2) durch Erhöhung des eingesetzten Volumens auf 1200 bzw. 1500 mL führt bei den Ansätzen 17/3 und 17/4 zu hellbeige gefärbten Produkten, die aber über einen deutlich geringeren Säuregehalt verfügen als die mit 1000 mL gespülten Proben (17/1 bzw. 17/2).

Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse müssen folgende Faktoren berücksichtigt werden: Für die Extraktionsversuche werden am Strand angespülte Proben von *Fucus vesiculosus* eingesetzt. Der Alginat-Gehalt dieser Braunalgen, der nativ zwischen etwa 15 – 40 % liegt (Lüning 1985, S. 284), kann durch Degenerationsprozesse zusätzlichen Schwankungen unterliegen. Gemäß Angaben von Overath/Luider (1994, S. 88) verderben die Algen innerhalb von 48 Stunden nach Entfernen aus ihrem natürlichen Lebensraum. Folglich ist damit zu rechnen, dass die für die Gewinnung verwandten Ausgangsproben bezüglich ihres Alginat-Gehaltes sehr heterogen sind.

Zum Zweiten ist zu bedenken, dass bei der zur Bestimmung des Reinheitsgrades durchgeführten Säure-Base-Titration neben Alginsäure auch andere saure Algeninhaltsstoffe erfasst werden. Dazu gehören z. B. Polyphenole, die zum Schutz vor Tierfraß in den Wasserpflanzen vorhanden sind und zu Verfärbungen des Endproduktes führen (vgl. Kapitel 2.4.2 des Theoretischen Teils). Dies erklärt möglicherweise, warum in stärker gefärbten Endprodukten höhere Säuregehalte gefunden werden (vgl. Tabelle 6).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch die zuvor diskutierten Verfahrensmodifikationen die für die Alginsäure-Gewinnung aus *Laminaria*-Spezies entwickelte Labormethode (Experiment 7 a)) auch für *Fucus vesiculosus* als Ausgangsmaterial anwendbar wird. Die aus Blasentang erhaltenen Produkte sind zwar noch stärker verfärbt als die aus *Laminaria* isolierten Algenpolysaccharide, aber insbesondere durch Einführung eines Reinigungsschrittes zur Entfernung löslicher Farbstoffe mittels Cellulose-Ionenaustauscher kann eine deutliche Verbesserung der Produktqualität erzielt werden (vgl. Abbildung 23).

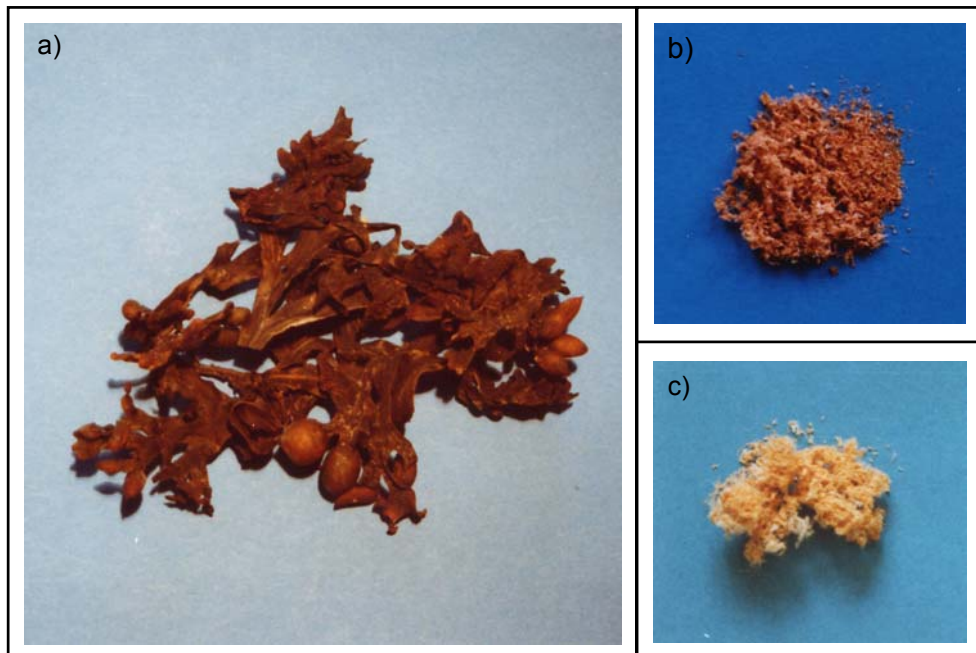


Abb. 23: Extraktion von Alginsäure aus *Fucus vesiculosus* (Experiment 7 b)): a) als Ausgangsmaterial eingesetzte getrocknete Braunalgen, b) Produkt ohne Entfärbung des Natriumalginat-Sols mit Adsorbens, c) durch Behandlung mit Cellulose-Ionenaustauscher gereinigtes Algenpolysaccharid (Tabelle 6, Ansatz 17/1) (Claußen/Marburger 2001, S. 22, 39, 44).

Die Veränderung des Arbeitsschrittes zur Ausfällung von Calciumalginat-Gel sowie die Dehydratisierung und weitere Entfärbung der wasserhaltigen Alginsäure mit einem größeren Ethanol-Volumen (vgl. Abbildung 21, Variation 3) tragen ebenfalls dazu bei.

Darüber, ob die Behandlung des Calciumalginat-Gels mit mehr als 1000 mL ethanolischer Salzsäure (vgl. Abbildung 21, Variation 2) zu Verbesserung der Alginsäure-Qualität führt, kann anhand der Ergebnisse in Tabelle 6 keine klare Aussage getroffen werden. Dieser Arbeitsschritt bleibt daher unverändert.

Das für die Gewinnung von Alginsäure aus *Fucus vesiculosus* optimierte Laborverfahren wird in Experiment 7 b) detailliert dargestellt.

2.4.3.3 Vereinfachte Isolierung von Rohalginat aus Braunalgen

Die im Vorangehenden vorgestellten Labormethoden zur Gewinnung von Alginsäure aus *Laminaria*-Spezies (Bretagne, Helgoland) und *Fucus vesiculosus* (Nordsee) sind aufgrund ihres hohen zeitlichen und gerätetechnischen Aufwandes zu komplex für die Durchführung im regulären Chemieunterricht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher noch ein Verfahren entwickelt, mit dem man auf sehr einfache Weise Rohalginat aus Braunalgen isolieren und bezüglich seines Gelbildungsverhaltens mit Calcium-Ionen und mit Säure untersuchen kann. Bei der Entwicklung des Experiments erfolgte ebenfalls eine Orientierung an den von Percival/McDowell (1990, S. 532 f.) und Whyte (1988, S. 168 – 173) vorgeschlagen Laborverfahren. Ein ähnlicher Schulversuch zur Gewinnung und Identifizierung von Natriumalginat aus Braunalgen wird auch von Lütke Twenhöven (1997, S. 43) beschrieben.

Als Ausgangsmaterial für die Alginat-Gewinnung kommen in Experiment 9 a) getrocknete Braunalgen der Spezies *Undaria pinnatifida* zum Einsatz. Diese Art spielt zwar für die industrielle Alginat-Gewinnung keine Rolle, ist aber für den schulischen Einsatz besonders geeignet, weil sie leicht zu beschaffen ist. *Undaria pinnatifida* (jap. Ito-Wakame) wird nämlich als Nahrungsmittel in der japanischen Küche verwandt und ist daher in Asia-Läden erhältlich.

Die Arbeitsvorschrift für die vereinfachte Isolierung von Rohalginat aus *Undaria pinnatifida* wird detailliert im Experimentellen Teil der Arbeit beschrieben. An dieser Stelle soll lediglich die prinzipielle Vorgehensweise erläutert werden (vgl. dazu auch Abbildung 24):

Zunächst behandelt man die gemahlene Braunalgen zehn Minuten mit verdünnter Salzsäure, um die im nativen Zustand vorliegenden Alkalimetall- und Erdalkalimetallalginat möglichst vollständig in Alginsäure zu überführen.

Der durch Filtration der Braunalgen-Salzsäure-Mischung erhaltene feste Algenrückstand wird anschließend – wie im industriellen Prozess – einer Behandlung mit warmer verdünnter Na_2CO_3 -Lösung unterzogen. Dabei wird die Alginsäure zu Natriumalginat umgesetzt. Als Produkt erhält man ein viskoses Algenpolysaccharid-Sol mit festen Cellulose- und Protein-Rückständen. Um die Fließfähigkeit des Sols zu erhöhen, wird es vor seiner Filtration zum Sieden erhitzt.

Da in den meisten Schulen keine Membranpumpen vorhanden sind, wurde nach günstig zu beschaffenden Filtrierhilfsmitteln gesucht, mit denen sich die festen Bestandteile aus dieser Natriumalginat-Lösung möglichst einfach und zügig abtrennen lassen. Aufgrund der Viskosität des Sols können Papierfilter für diesen Prozess nicht eingesetzt werden, da sie sofort verstopfen. Aber auch zu grobmaschige Utensilien, wie z. B. Haushaltssiebe aus Plastik oder Teesiebe aus Baumwollstoff, haben sich als ungeeignet erwiesen. Diese ermöglichen zwar ein schnelles Abfließen der Natriumalginat-Lösung, aber lassen gleichzeitig auch kleine Feststoff-Partikel passieren.

Für die Abtrennung der Cellulose- und Protein-Rückstände aus dem Natriumalginat-Sol haben sich jedoch in Versuchsreihen mehrfach einsetzbare Kaffeefilter aus Edelstahlge- webe bewährt, die im Haushaltswarenbedarf relativ günstig erhältlich sind.

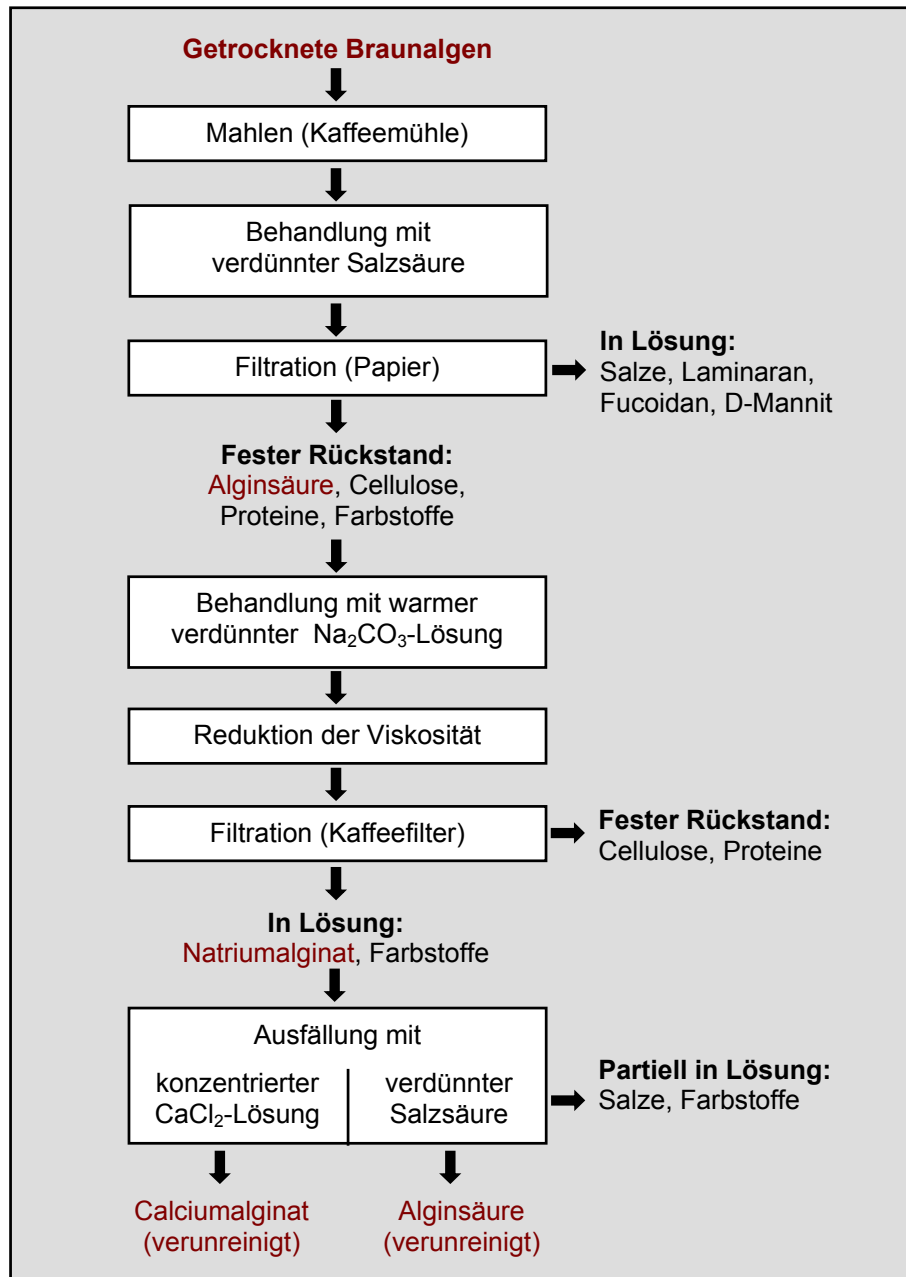


Abb. 24: Vereinfachte Isolierung von Rohalginat aus getrockneten Braunalgen (Experiment 9 a): *Undaria pinnatifida* (Asia-Laden), Experiment 9 b): *Fucus vesiculosus* (Nordsee).

In Analogie zum großtechnischen Prozess bringt man im letzten Teil des Versuches einen Teil der als Filtrat erhaltenen Natriumalginat-Lösung in konzentrierte Calciumchlorid-Lösung ein. Das dabei als Präzipitat anfallende Calciumalginat-Gel, das noch durch adsorbierte Photosynthesefarbstoffe verunreinigt ist, wird aber aus zeitlichen Gründen nicht mehr weiter aufgearbeitet.

Mit einer zweiten Filtrat-Portion demonstriert man abschließend, dass das aus den Braunalgen isolierte Natriumalginat auch mit verdünnter Salzsäure Gele zu bilden vermag.

In Experiment 9 b) wird eine leicht modifizierte Vorgehensweise vorgestellt, mit der sich auch aus bei uns heimischen Braunalgen Rohalginat isolieren lässt. Zum Einsatz kommt hier der so genannte Blasentang (*Fucus vesiculosus*), der in relativ großen Mengen an den Stränden der Nordsee angespült wird.

Wenn die Möglichkeit besteht, die Lernenden selbst gesammelte und getrocknete Braunalgen für die Alginat-Gewinnung verwenden zu lassen, hat das unter Umständen einen motivationsfördernden Effekt. Außerdem wird den Schülern dabei bewusst, dass die beim Baden eher als unangenehm oder gar ekelerregend eingeschätzten Strandalgen durchaus nützlich sein können.

2.5 Organische Derivate

2.5.1 Chemischer Aufbau und Darstellung

Propylenglykolalginat (PGA) ist das einzige organische Derivat der Alginsäure, das wirtschaftliche Bedeutung erlangt hat (Belitz/Grosch 1982, S. 240; Cotrell/Kovacs 1990, S. 2-2). In Abbildung 25 wird die Struktur dieses Esters wiedergegeben.

Die Synthese von Propylenglykolalginat erfolgte erstmals 1944 (Cotrell/Kovacs 1990, S. 2-2.). In den darauf folgenden Jahren wurde das Darstellungsverfahren patentiert und methodisch optimiert (Steiner 1947, Steiner/ McNeely 1950; zitiert in Moe et al. 1995, S. 280). Die Details des heute angewandten großtechnischen Prozesses zur Produktion von Propylenglykolalginat unterliegen dem Firmengeheimnis. Bekannt ist aber das Syntheseprinzip (Falbe/Regitz 1995 a, S. 96; Voragen/Pilnik 1994, S. 37, Mohamed 1981, S. 3): Unter moderatem Druck lässt man wasserhaltige Alginsäure-Fasern, deren Carboxyl-Gruppen zu 10 – 20 % mit Basen zu Carboxylat-Funktionen umgesetzt wurden, mit einem Überschuss an Propylenoxid reagieren.

In Gleichung (12) wird am Beispiel von Mannuronsäure (1) ein möglicher Mechanismus für die PGA-Darstellung formuliert:

Das durch Deprotonierung der Säure (1) erzeugte Carboxylat-Ion (2) greift nucleophil an dem niedriger substituierten C-Atom des Propylenoxids (3) an. Unter Ringöffnung bildet sich ein Alkoholat-Anion (4), das in einer Säure-Base-Reaktion mit einem weiteren Alginsäure-Molekül (1) zu Propylenglykolmannuronat (5) umgesetzt wird. Das bei diesem Vorgang als zweites Produkt entstehende Carboxylat-Nucleophil (2) kann wiederum mit einem Epoxid-Molekül reagieren.

Mohamed (1981, S. 4) schlägt eine mechanistische Alternative für die PGA-Synthese vor, die nicht über eine baseninduzierte Öffnung des Oxiran-Ringes verläuft.

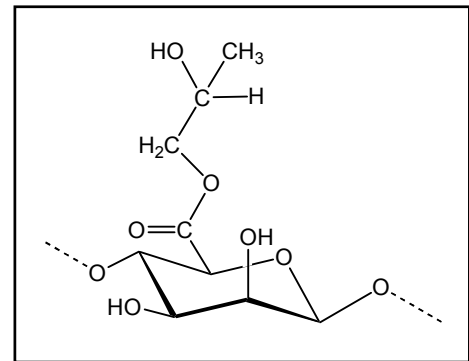
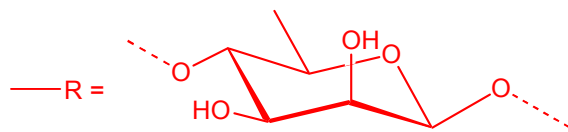
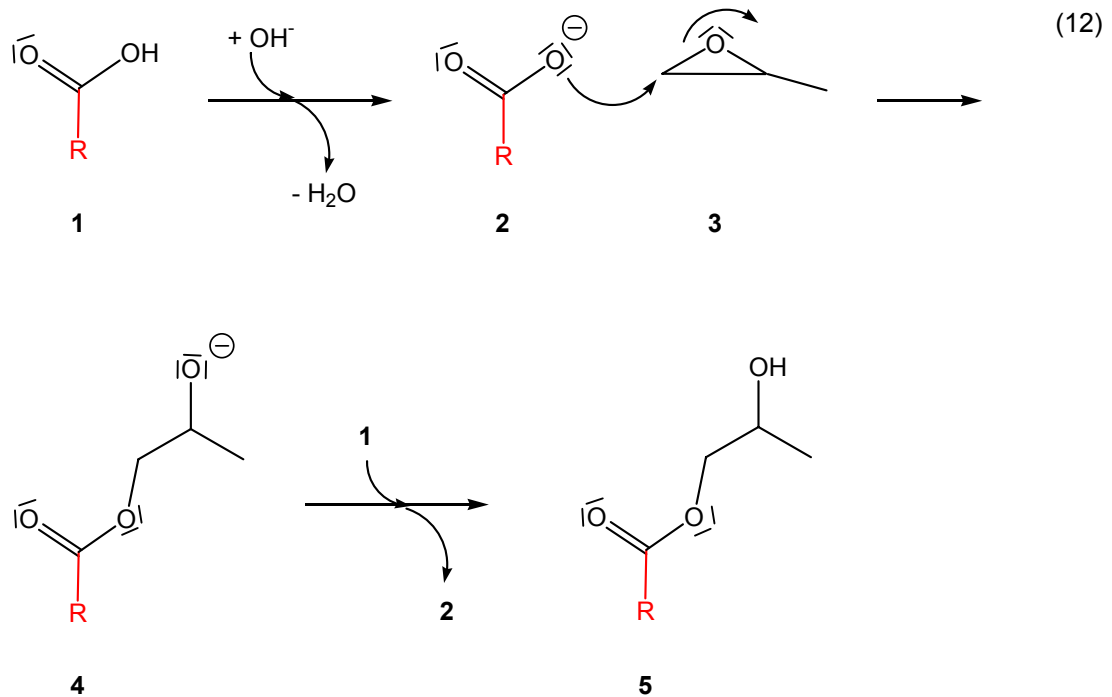


Abb. 25: Struktur einer Propylenglykolmannuronat-Einheit (Sime 1990, S. 57; Voragen/ Pilnik 1994, S. 37).



Um eine ausreichende Reaktivität der Alginsäure zu gewährleisten, hat sich als entscheidend erwiesen, die Fasern zunächst in Wasser quellen zu lassen, da ansonsten die starken Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Algenpolysaccharid-Ketten den Angriff des Propylenoxids erschweren. Die im wässrigen Milieu als Konkurrenzreaktion zu erwartende Hydrolyse des Epoxids wird offensichtlich durch die hohe Reaktionsgeschwindigkeit der Veresterung so weit zurückgedrängt, dass bei Einsatz eines Überschusses dieser Verbindung ausreichend große Ausbeuten zu erzielen sind (Steiner/McNeely 1951, S. 2074).

Nach dem beschriebenen Verfahren lassen sich bis zu 90 % der Carboxyl-Gruppen in der Alginsäure derivatisieren (Sime 1990, S. 57). Die im Handel erhältlichen Propylenglykolalginat haben aber – in Abhängigkeit vom Einsatzzweck – lediglich Veresterungsgrade zwischen 50 und 85 %.

2.5.2 Charakteristische Eigenschaften

Der erhaltene Alginsäureester unterscheidet sich in seinen Eigenschaften in dreierlei Hinsicht deutlich von Alginaten:

Aufgrund der Tatsache, dass im Propylenglykolalginat ein Großteil der Carboxyl-Funktionen verestert vorliegt, weist diese Verbindung eine weitaus größere Säuretoleranz auf. Während die Carboxylat-Gruppen der Alginat-Polyanionen entsprechend dem pK_s der Alginsäure bei pH-Werten unterhalb 3,5 protoniert werden und in Form von Gelen bzw. schwerlöslichen Niederschlägen ausfallen, bleibt PGA bis zu $pH = 2,75$ löslich (King 1983, S. 176 ff.; Onsøyen 1997, S. 41; Voragen/Pilnik 1994, S. 38).

Des Weiteren ist bei Propylenglykolalginat auch die Gelbildungsfähigkeit mit Calcium-Ionen stark eingeschränkt (Sime 1990, S. 64): In dem Alginsäure-Derivat stehen nicht nur weniger Carboxylat-Funktionen für die Chelatisierung der Erdalkalimetall-Kationen zur Verfügung, sondern die vorhandenen Propylenglykolester-Gruppen erschweren auch die für die Einlagerung von Calcium-Ionen notwendige Annäherung der Algenpolysaccharid-Sequenzen. Ob eine Reaktion erfolgt, hängt vom Grad der Veresterung ab: Bei 60 % oder weniger bilden sich noch sehr weiche Calcium-Gele, während bei mehr als 85 % überhaupt keine signifikante Änderung der Viskosität der PGA-Lösung mehr zu beobachten ist.

Die dritte besondere Eigenschaft des Propylenglykolalginats wird ebenfalls durch das Vorliegen der Ester-Funktion bedingt, die einen deutlich lipophileren Charakter aufweist als die Carboxyl-Gruppe. Daher wirkt es – im Gegensatz zum Alginat selbst – in dispersen Systemen nicht nur als Verdickungsmittel und Schutzkolloid, sondern stellt einen echten Emulgator dar (King 1983, S. 176 ff.; Onsøyen 1997, S. 41).

Wegen des im Vorangehenden diskutierten Reaktionsverhaltens ist PGA besonders effektiv als Verdickungsmittel, Stabilisator und Emulgator in sauren Nahrungsmitteln einsetzbar (vgl. Kapitel 2.6.2.2 des Theoretischen Teils).

2.6 Ausgewählte Anwendungsmöglichkeiten

2.6.1 Übersicht

Tabelle 7 gibt Aufschluss über ausgewählte alltagsrelevante Anwendungen der Alginat. Etwa ein Drittel der Weltjahresproduktion des Algenpolysaccharids wird in der Lebensmittelindustrie eingesetzt (Marinalg 2003 a; Voragen/Pilnik 1994, S. 40). Für den Rest gibt es eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten auf ganz unterschiedlichen Sektoren.

In allen angeführten Anwendungsbereichen werden Eigenschaften der Alginat ausgenutzt, die bereits in Kapitel 2.3 dieser Arbeit diskutiert wurden. Dazu gehören vor allem das charakteristische Sol- und Gelbildungsverhalten dieser Polysaccharid-Derivate sowie deren emulsions- und suspensionsstabilisierende Wirkung. Weitere anwendungsrelevante Eigenschaften der Alginat sind deren Filmbildungs- und Kationenaustauschfähigkeit.

In Bezug auf die Einsatzmöglichkeiten der Alginat werden in der vorliegenden Arbeit zwei grundlegende Ziele verfolgt:

Zum einen sollen bereits existierende Alltagsanwendungen der Algenpolysaccharide in der Lebensmittelindustrie und Biotechnologie, im medizinisch-pharmazeutischen Bereich sowie bei der Wasseraufbereitung aufgegriffen und in einfach durchführbare Schul- bzw. Praktikumsversuche umgesetzt werden. Dabei liegt das Hauptaugenmerk darauf, technische Verfahren didaktisch so zu reduzieren, dass deren chemische Hintergründe auf anschauliche Weise vermittelt bzw. von den Lernenden eigenständig erarbeitet werden können (vgl. dazu Kapitel 2.6.2 – 2.6.4).

Zum zweiten sollen Experimente zu potentiellen neuen Einsatzmöglichkeiten der Alginat durchgeführt werden, bei denen man sich die besonderen Eigenschaften dieser Polysaccharid-Derivate zunutze machen kann. Die mit diesem Themenkomplex verbundenen Inhalte werden in Kapitel 2.6.5 diskutiert.

Tab. 7: Ausgewählte Anwendungen von Alginaten im Alltagsleben (Firma Pronova Biopolymer, S. 18 – 25; Lüning 1985, S. 290; Onsøyen 1996, S. 26 – 31; Onsøyen 1997, S. 42 f.; Steinegger/Hänsel 1992, S. 138 – 140; Voragen/Pilnik 1994, S. 22, 39 f.).

Einsatzbereiche	Ausgenutzte Eigenschaften
<u>Lebensmittelindustrie</u> <ul style="list-style-type: none"> • Puddings, Mousse und andere Desserts • Cremefüllungen und Fruchtzubereitungen für Backwaren • Restrukturierte Lebensmittel 	Gelbildung
<ul style="list-style-type: none"> • Eis • Milchmodgetränke • Suppen • Soßen • Mayonnaise • Salatdressings 	Verdickung, Stabilisierung
<ul style="list-style-type: none"> • Überzüge/Schutzfilme für Tiefkühl-Fisch, Fleischprodukte und Backwaren 	Filmbildung
<u>Papierindustrie</u> <ul style="list-style-type: none"> • Beschichtungsmittel für Papier und Karton 	Filmbildung
<u>Textildruck</u> <ul style="list-style-type: none"> • Regulierung des Fließverhaltens von Textildruckpasten, • Fixierung des Farbstoffes 	Verdickung, Stabilisierung
<u>Farbmittelindustrie</u> Pigmentstabilisierung, Konsistenzverbesserung	Verdickung, Stabilisierung
<u>Biotechnologie</u> Immobilisierung von Biokatalysatoren	Gelbildung
<u>Medizin/Pharmazeutische Industrie</u> <ul style="list-style-type: none"> • Wundauflagen (z. B. Pflaster, Tamponaden, Kompressen) • Dentalabdruckmassen • Arzneimittel gegen Sodbrennen • Dekorporierung von radioaktivem ⁹⁰Sr • Kontrollierte Freisetzung von Medikamenten (Retard-Tabletten) 	Sol- und Gelbildung, Kationenaustausch Sol- und Gelbildung Sol- und Gelbildung Gelbildung, Kationenaustausch Sol- und Gelbildung, Kationenaustausch
<u>Kosmetikindustrie</u> <ul style="list-style-type: none"> • Cremes und Lotionen • Haut- und Haargele 	Verdickung und Stabilisierung Gelbildung
<u>Wasseraufbereitung</u> <ul style="list-style-type: none"> • Bindung zwei- und mehrwertiger Metall-Kationen • Flockungshilfsmittel 	Gelbildung, Kationenaustausch

2.6.2 Lebensmittelindustrie

2.6.2.1 Alginat

Da die Lebensmittelindustrie einen Hauptanwendungsbereich der Alginat darstellt (Marinalg 2003 a; Voragen/Pilnik 1994, S. 40), soll in der vorliegenden Arbeit eine genauere Auseinandersetzung mit ausgewählten Einsatzmöglichkeiten des Algenpolysaccharids auf diesem kommerziell bedeutsamen Sektor erfolgen.

Kennzeichnungspflicht nach Lebensmittelrecht

Bei Alginsäure und ihren essbaren Salzen handelt es sich nicht um charakteristische Zutaten für Lebensmittel, sondern um Stoffe, die diesen aus technologischen Gründen zugefügt werden. Die Polysaccharid-Derivate gehören daher zur Gruppe der zulassungs- und kennzeichnungspflichtigen Lebensmittelzusatzstoffe. Ihre Anwesenheit in Fertigprodukten muss dem Verbraucher durch Angabe des Einsatzzweckes sowie des Namens bzw. der E-Nummer der zugesetzten Substanz deutlich gemacht werden (Falbe/Regitz 1994 c, S. 2471 f.). Nach EU-Recht sind für Alginsäure und ihre Salze die in Tabelle 8 aufgelisteten E-Nummern zu verwenden:

Tab. 8: Kennzeichnung von Alginsäure und ihren Salzen durch E-Nummern (Askar 1982, S. 168; King 1983, S. 118; Pilnik/Voragen 1980, S. 91).

Substanz	E-Nummer
Alginsäure	E 400
Natriumalginat	E 401
Kaliumalginat	E 402
Ammoniumalginat	E 403
Calciumalginat	E 404

Physiologische Wirkung und Toxizität

Da Alginat von den Enzymen des menschlichen Körpers nicht abgebaut werden können, gehören sie zu den unverdaulichen Polysacchariden (Steinegger/Hänsel 1992, S. 138). Folglich tragen sie nicht zum Nährwert der Lebensmittel bei, denen sie zugesetzt werden. In allen bisher durchgeführten Untersuchungen haben sich Alginat als nicht toxisch erwiesen und werden daher generell als gesundheitlich unbedenklich eingeschätzt (Cottrell/Kovacs 1980, S. 2-17 f.; Steinegger/Hänsel 1992, S. 138).

Von dem Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) wurden der Alginsäure und ihren essbaren Natrium-, Kalium-, Ammonium- und Calcium-Salzen unbegrenzte ADI-Werte zugeteilt (Firma Pronova Biopolymer, S. 26). Unter ADI (engl. acceptable daily intake) ist dabei gemäß einer gemeinsamen Definition der World Health Organization (WHO) und der Food and Agriculture Organization (FAO) diejenige Menge eines Stoffes zu verstehen, die für den Menschen bei täglicher lebenslanger Aufnahme kein Risiko darstellt (Falbe/Regitz 1995 a S. 55). Die Einstufung „ADI not specified“ ist die bestmögliche, die ein Lebensmittelzusatzstoff erhalten kann (Firma Pronova Biopolymer, S. 26).

In Deutschland sind Alginsäure und ihre essbaren Salze (E 400 – E 404) ohne Beschränkung der Höchstmenge für Lebensmittel generell zugelassen (ZZuIV 2003 a).

Nutzung

Wie in Abbildung 26 deutlich wird, nutzt man beim Einsatz von Alginaten in Lebensmitteln in erster Linie drei ihrer in Kapitel 2.3 diskutierten charakteristischen Eigenschaften aus (Voragen/Pilnik 1994, S. 39 f.):

Eigenschaft	Bildung viskoser Sole Emulgier- und Suspendiervermögen	Gelbildung mit Ca^{2+}
Verwendungszweck	Verdickungsmittel Stabilisator	Geliermittel
Einsatzbeispiele	<ul style="list-style-type: none"> • Eis • Milchmixgetränke • Suppen • Soßen • Mayonnaise • Salatdressings 	<ul style="list-style-type: none"> • Tortenfüllungen • Desserts auf Milch- und Wasserbasis • Puddings • Restrukturierte Lebensmittel

Abb. 26: Alginate als Lebensmittelzusatzstoffe: Funktion und Einsatzbeispiele (Glicksman 1987, S. 37; Onsøyen 1997, S. 42 f.; Pilnik/Voragen 1980, S. 90).

Da in Wasser dispergierte Alkalimetallalginat hochviskose Sole bilden und zudem emulsions- und suspensionsstabilisierende Fähigkeiten haben, finden sie z. B. als Verdickungsmittel und Stabilisatoren in Eis, Milchmixgetränken, Suppen, Soßen, Mayonnaise und Salatdressings Verwendung (Glicksman 1987, S. 37; Onsøyen 1997, S. 42 f.; Pilnik/Voragen 1980, S. 90).

Alginat eignet sich aber nur als Verdickungsmittel und Stabilisator für Systeme, deren Säure- und Calcium-Gehalte so niedrig liegen, dass keine Bildung von Alginsäure- oder Calciumalginat-Gelen erfolgt. In Nahrungsmitteln, die diese Bedingungen nicht erfüllen, lässt sich alternativ Propylenglykolalginat verwenden (vgl. Kapitel 2.6.2.2).

Wegen ihrer charakteristischen Eigenschaft, mit Calcium-Ionen Gele zu bilden, kommen Alginat außerdem als Geliermittel in Tortenfüllungen, verschiedenartigen Dessertzubereitungen auf Milch- und Wasserbasis sowie in Puddings zum Einsatz (Firma Kelco 1994, S. 12 – 18; Glicksman 1987, S. 37; Onsøyen 1997, S. 42 f.).

Wie aus Abbildung 26 hervorgeht, wird das Gelbildungsvermögen der Alginat zudem in einem relativ neuen, aber immer mehr an Bedeutung gewinnenden Bereich der Lebensmitteltechnologie ausgenutzt – nämlich bei der sogenannten Restrukturierung von Lebensmitteln.

Unter restrukturierten oder rekonstituierten Nahrungsmitteln versteht man Produkte, deren Herstellung durch Formung von Frucht-, Gemüse-, Fleisch- oder Fisch-Konzentraten erfolgt. Dies kann z. B. unter Ausnutzung der Gelbildungsreaktion von Alginat mit Calcium-Ionen geschehen.

Zu den auf dem Markt befindlichen Erzeugnissen, die mit Hilfe von Calciumalginat-Gelen restrukturiert werden, gehören beispielsweise geformte Johannisbeeren, Kirschen, Pfirsichhälften und Apfelstücke. Diese künstlichen Früchte kommen vor allem in Fertigsüßspeisen und -backwaren zum Einsatz. Des Weiteren werden Gemüse-Analoga, wie z. B. frittierte Zwiebelringe und Paprikastreifen zur Füllung von Oliven, hergestellt. Außerdem rekonstituiert man mit Calciumalginat Steak-, Fischfilet-, Shrimps- und Kaviar-Imitationen (Firma Kelco 1994, S. 5 – 11; Glicksman 1987, S. 37 – 40; Onsøyen 1997, S. 36).

Mit der Restrukturierung von Lebensmitteln sind aus industrieller Sicht folgende Vorteile verbunden (Glicksman 1987, S. 37; Onsøyen 1997, S. 36): Dadurch, dass man zur Herstellung rekonstituierter Erzeugnisse preisgünstige Rohmaterialien, wie z. B. in der Nahrungsmittelverarbeitenden Industrie anfallende Obst-, Gemüse-, Fleisch- und Fischreste, verwenden kann, ist eine Verringerung der Produktionskosten möglich. Da bei restrukturierten Lebensmitteln zudem die Möglichkeit besteht, durch Einflussnahme auf Größe, Form und mechanische Charakteristika identische Produkte zu erzeugen, ist deren prozesstechnische Handhabung viel leichter automatisierbar.

Die mit der Rekonstituierung von Lebensmitteln verknüpften Vorgänge sollen in dieser Arbeit am Beispiel der Herstellung restrukturierter Paprikastreifen veranschaulicht werden. Traditionell mussten die zur Füllung von Oliven verwandten Paprikastreifen manuell aus den frischen Schoten des Gemüses zugeschnitten und dann in Handarbeit jeweils einzeln in die Früchte des Ölbaums eingebracht werden. Erst durch die Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung restrukturierter Paprikastreifen wurde die Basis für eine vollkommene Automatisierung dieses Prozesses geschaffen (Glicksman 1987, S. 38).

Heute geht man großtechnisch wie folgt vor (Firma Kelco 1994, S. 9; Onsøyen 1997, S. 37):

Zunächst wird eine wässrige Lösung von Natriumalginat und Guarkernmehl mit Paprika-Konzentrat vermischt. Das dabei erhaltene hochviskose Hydrokolloid-Paprika-Gemisch wird maschinell in Form einer 2 – 6 mm dicken Schicht auf ein Fließband aufgebracht und von oben und unten mit Calciumchlorid-Lösung besprüht (vgl. Abbildung 27).

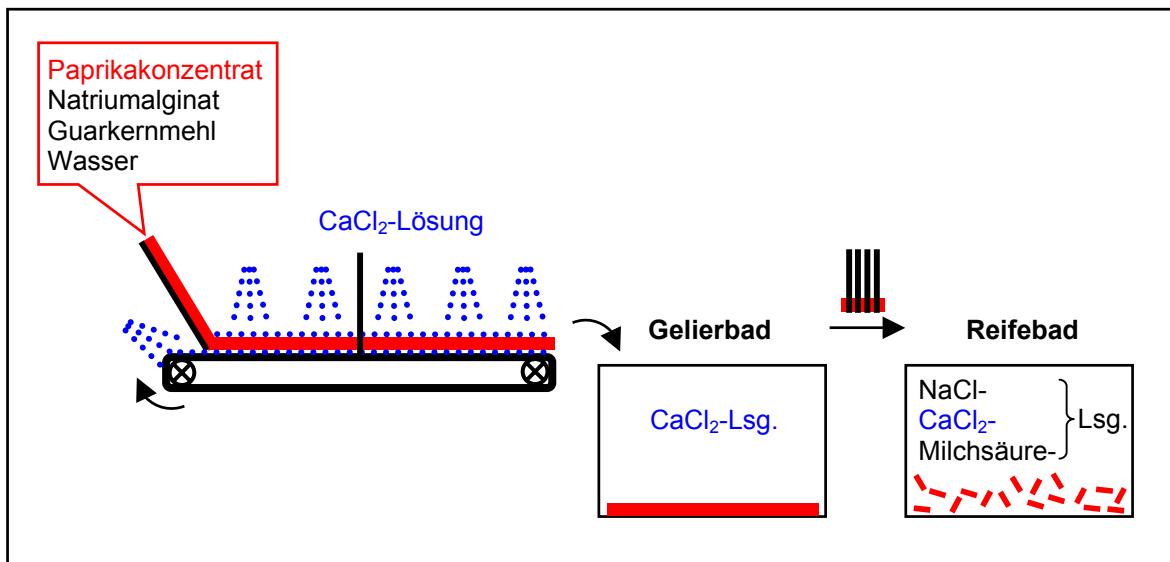
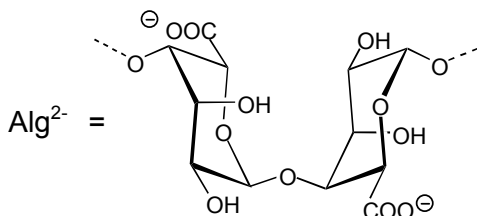
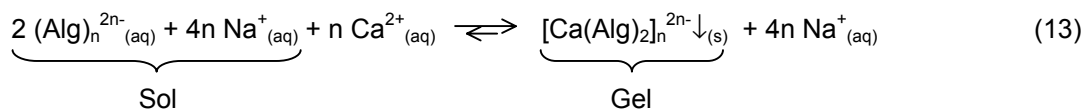


Abb. 27: Industrielles Verfahren zur Herstellung von restrukturierten Paprikastreifen – Schematische Darstellung (verändert nach Onsøyen 1997, S. 37).

Auf diese Weise initiiert man an der oberen und der unteren Fläche der schichtförmigen Restrukturierungs-Masse die Gelierung des Alginats mit Calcium-Ionen, die formal nach der in Gleichung (13) beschriebenen Reaktion abläuft:



Zur Vervollständigung der Gelbildung wird anschließend die Hydrokolloid-Paprika-Masse in ein aus Calciumchlorid-Lösung bestehendes Gelierbad eingetaucht. Je nach Schichtdicke der Masse kann dieser Prozess 30 Minuten und länger dauern. Das als Produkt erhaltene paprikahaltige Calciumalginat-Gel wird in gleichmäßige dünne Streifen geschnitten.

Die restrukturierten Paprikastreifen sind zwar sehr fest, aber nicht elastisch genug, um für die Füllung von Oliven verwandt werden zu können. Sie müssen daher noch mehrere Tage in einem Reifebad aufbewahrt werden, welches Natrium- und Calciumchlorid sowie Milchsäure als Säuerungsmittel enthält. Hier erfolgt aufgrund des hohen Überschusses an Na^+ gegenüber Ca^{2+} eine teilweise Wiederauflösung des Gels unter Rückbildung des Sols (vgl. Rückreaktion in Gleichung (13)).

Mit dieser Reaktion geht eine Verringerung der Brüchigkeit des Gels einher. Die Umstrukturierung des Gelgerüsts ist außerdem mit Synäreseffekten verbunden, d. h. mit einem partiellen Austritt der in den Zwischenräumen des dreidimensionalen Gelnetzwerkes vorhandenen Wasser-Moleküle (Falbe/Regitz 1995 b, S. 1511; Firma Kelco 1994, S. 9; Onsøyen 1997, S. 37).

Um die dadurch eintretende Schrumpfung der restrukturierten Paprikastreifen zu minimieren, enthalten diese zusätzlich zu dem als Geliermittel fungierenden Alginat als Verdickungsmittel und Wasserbinder Guarkernmehl. Hauptbestandteil des letzteren ist das Polysaccharid Guar. Dabei handelt es sich um ein Polygalactomannan, dessen lineares Grundgerüst aus 1,4-glykosidisch verknüpften β -D-Mannose-Resten besteht. Durchschnittlich jede zweite dieser Mannose-Einheiten ist in der C-6-Position mit einem α -D-Galactose-Rest substituiert (Fox 1997, S. 269).

Nach Aufbewahrung im Reifebad verfügen die Paprikastreifen über eine feste, aber gleichzeitig sehr elastische Beschaffenheit. Sie können nun maschinell mit Hilfe einer speziell zu diesem Zweck entwickelten Vorrichtung, der sogenannten „olive stuffing machine“ (Firma Kelco, S. 9), in haarnadelartig gebogener Form in die entkernten Oliven eingebracht werden. Abbildung 28 verdeutlicht diesen Vorgang schematisch.

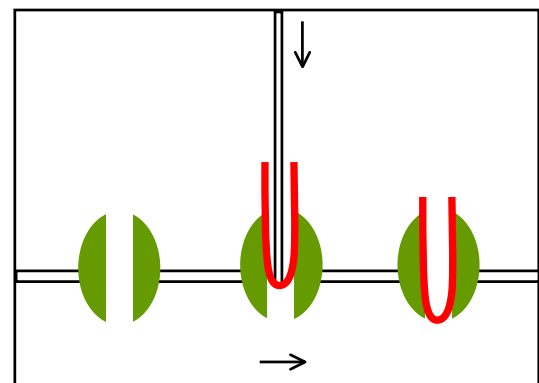


Abb. 28: Maschinelle Füllung von Oliven mit restrukturierten Paprikastreifen (Vertikalschnitt); Zeichnung nach Angaben in Firma Kelco (1994, S. 9).

Experimentelle Veranschaulichung

Die lebensmitteltechnologischen Einsatzmöglichkeiten von Alginaten sollen in der vorliegenden Arbeit anhand von zwei Versuchen verdeutlicht werden:

Experiment 10 demonstriert auf einfache, aber anschauliche Weise die Wirksamkeit von Natriumalginat als Emulsions- und Suspensionsstabilisator für ein selbst hergestelltes Salatdressing mit Öl und Kräutern. Während das algenpolysaccharidhaltige Dressing über längere Zeit stabil bleibt, tritt in der Blindprobe mit entionisiertem Wasser schon nach kurzer Zeit eine Phasentrennung ein: Öl und Kräuter schwimmen auf der wässrigen Phase auf.

In Experiment 11 wird eine apparativ wenig aufwändige Labormethode zur Herstellung restrukturierter Paprikastreifen vorgestellt, die sich in weiten Teilen an den von der Firma Kelco (1994, S. 9) und Onsøyen (1997, S. 37) beschriebenen Industrieverfahren orientiert. In dem Versuch werden die zentralen Verfahrensschritte experimentell und theoretisch so vereinfacht, dass sie für Schüler gut nachvollziehbar sind. Dennoch wird den Lernenden bewusst, wie komplex die chemischen und physikalischen Vorgänge sind, die mit dem „Lebensmittel-Design“ im Zusammenhang stehen.

Die Restrukturierung der Paprikastreifen erfolgt in Experiment 11 nach folgendem Prinzip: Aus einem Püree roter Paprikaschoten stellt man durch Filtration zunächst ein Paprika-konzentrat her. Das Konzentrat wird daraufhin im Massenverhältnis 1 : 4 mit einem Hydrokolloid-Sol vermischt, welches Natriumalginat ($\rho^* = 19 \text{ g/L}$) und Guarkernmehl ($\rho^* = 9,5 \text{ g/L}$) enthält. Die resultierende Masse wird in dünner Schicht in einer Kristallisierschale ausgestrichen, durch Besprühen mit $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,1$) oberflächlich zum Gelieren gebracht und in einem Bad mit derselben Lösung vollständig ausgehärtet. Mit dem Fortschreiten der Gelbildung geht dabei eine Kontraktion der Restrukturierungsmasse einher. Das erhaltene schichtförmige Paprika-Calciumalginat-Gel schneidet man anschließend in Streifen der Abmessungen $0,5 - 0,6 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$.

Um das Prinzip der Rekonstitution von Paprika zu veranschaulichen, ist es ausreichend, Experiment 11 bis zu diesem Punkt durchzuführen. Soll zusätzlich noch die Veränderung der Gelbeschaffenheit im Reifebad demonstriert werden, bewahrt man die hergestellten Paprikastreifen über Nacht luftdicht verschlossen in einer wässrigen Lösung von Calciumchlorid-Dihydrat ($w = 0,03$), Natriumchlorid ($w = 0,08$) und Milchsäure ($w = 0,008$) auf.

Abbildung 29 zeigt die in Experiment 11 hergestellten Paprikastreifen nach Aufbewahrung im Reifebad sowie handelsübliche Oliven, die mit dem restrukturierten Produkt gefüllt sind.

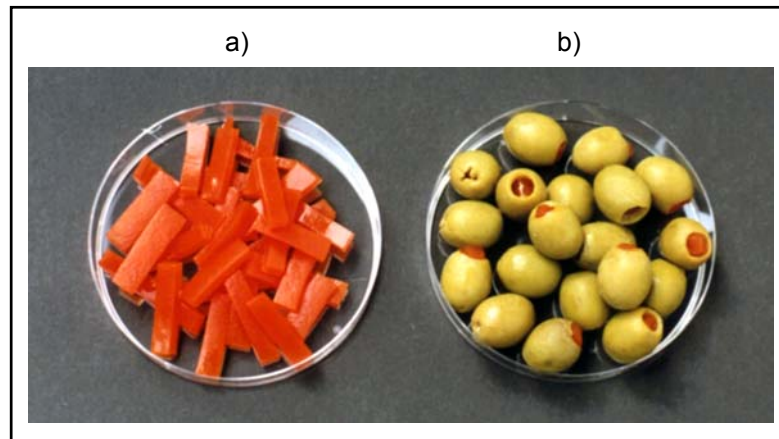


Abb. 29: Restrukturierung von Paprikastreifen: a) Produkt aus Experiment 11, b) im Handel erhältliche Oliven, die mit dem rekonstituierten Gemüse gefüllt sind.

2.6.2.2 Propylenglykolalginat

Toxikologische und lebensmittelrechtliche Beurteilung

In Langzeitversuchen mit verschiedenen Tieren (u. a. Ratten und Mäuse) hat sich Propylenglykol weder als carcinogen noch als teratogen erwiesen. In-Vitro- und In-Vivo-Studien mit Säugetier-Zellen konnten zudem belegen, dass der Ester keine Chromosomen-Aberrationen hervorruft. Des Weiteren haben sich auch in einer 23-tägigen Testreihe mit menschlichen Probanden, in denen pro Person täglich 200 mg PGA pro Kilogramm Körpergewicht oral aufgenommen wurden, keine gesundheitlichen Beeinträchtigungen ergeben. Im Hinblick auf das allergene Potential von Propylenglykolalginat ist zu bemerken, dass der Ester bei diesbezüglich vorbelasteten Testpersonen leichte Hautirritationen hervorgerufen hat, die in der Kontrollgruppe mit Nichtallergikern nicht zu beobachten waren (Speijers/van Apeldoorn 2003).

Durch In-vitro-Studien zur Hydrolyse von Propylenglykolalginat konnte gezeigt werden, dass unter simulierten Magen-Bedingungen kein Abbau des Alginsäureesters erfolgt. Im Reaktionsmilieu des Darms findet jedoch die Spaltung von PGA in Alginat und 1,2-Propandiol zu einem beträchtlichen Maße statt: Nach 4 Stunden sind etwa 25 %, nach 12 Stunden 65 % des Esters hydrolysiert (Speijers/van Apeldoorn 2003).

Durch radioaktive Markierungsversuche wurde festgestellt, dass der durch Hydrolyse freigesetzte Alkohol zum Teil resorbiert wird, während das entstandene Alginat sowie nicht umgesetztes PGA unverdaut ausgeschieden werden (Speijers/van Apeldoorn 2003).

Vom Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) wurde Propylenglykolalginat ein ADI von 0 – 70 mg pro kg Körpergewicht zugeteilt. Diese Einschätzung basiert auf der Annahme, dass von PGA ausgehende gesundheitliche Gefahren nur durch resorbiertes 1,2-Propandiol bedingt werden. Da der ADI-Wert für Propylenglykol 0 – 25 mg/kg beträgt und PGA nur etwa 36 % dieses Alkohols enthält, ergibt sich für den Alginsäureester rechnerisch die oben angegebene ADI-Empfehlung von maximal 70 mg/kg. Dabei wird vorausgesetzt, dass im Körper eine vollständige Hydrolyse des PGA und Resorption des dabei entstehenden Propylenglykols erfolgt (Pronova Biopolymer, S. 26, Speijers/van Apeldoorn 2003).

In der EU wird Propylenglykolalginat durch die E-Nummer E 405 gekennzeichnet. Auch in Deutschland ist dieser Ester inzwischen als Zusatzstoff zugelassen. Während Alginsäure und ihre essbaren Salze (E 400 – E 404) allerdings in unbegrenzter Menge für Lebensmittel allgemein verwendet werden dürfen, ist der Gebrauch von PGA mit Angaben für Höchstmengen auf 15 Einsatzzwecke beschränkt (ZZuIV 2003 a, b). Einige Beispiele werden in Tabelle 9 aufgeführt.

Tab. 9: Ausgewählte Lebensmittel, in denen in Deutschland der Zusatz von PGA gestattet ist (ZZuIV 2003 b).

Produkt	Höchstmenge
Fettemulsionen	3 g/kg
Feine Backwaren	2 g/kg
Füllungen, Glasuren und Überzüge für Feine Backwaren und Desserts	5 g/kg
Speiseeis auf Wasserbasis	3 g/kg
Saucen	8 g/kg
Obst- oder Gemüsezubereitungen	5 g/kg
Nichtalkoholische, aromatisierte Getränke	300 mg/L
Bier	100 mg/L
Cider	100 mg/L
Diätlebensmittel	1,2 g/kg

PGA darf allerdings nicht als Bierschaumstabilisator für Erzeugnisse benutzt werden, die unter der Bezeichnung „nach dem deutschen Reinheitsgebot gebraut“ in den Handel kommen (ZZuIV 2003 a).

Nutzung

Die Eigenschaften, in denen sich PGA von herkömmlichen Alginaten unterscheidet wurden bereits in Kapitel 2.5.2 eingehend diskutiert. Es sind insbesondere die

- gute Säuretoleranz,
- die verminderte Gelbildungsfähigkeit mit Calcium-Ionen sowie
- die kombinierte Wirksamkeit als Emulgator, Verdickungsmittel und Schutzkolloid,

die den Alginsäureester so geeignet für den Einsatz als Stabilisator in Nahrungsmitteln mit niedrigen pH-Werten und/oder hohen Calcium-Gehalten machen (Firma Pronova Biopolymer, S. 18; Firma ISP). Wichtige lebensmitteltechnologische Anwendungsbeispiele des Alginsäureesters werden in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tab. 10: Einsatz von PGA in sauren Lebensmitteln (Cotrell/Kovacs 1980, S. 2-25; ISP 2003; Onsoyen 1997, S. 41).

Produkt	Funktion
Säurehaltige Salatdressings (z. B. Vinaigrette)	<ul style="list-style-type: none"> • Verhinderung der Separation von Öl- und Wasser-Phase durch emulgierende und emulsionsstabilisierende Wirkung • Verbesserung der sensorischen Eigenschaften von fettreduzierten Soßen
Fruchtsaftgetränke	<ul style="list-style-type: none"> • Unterbinden des Absetzens von Fruchtfleisch
Joghurt, Milchmixgetränke mit niedrigen pH-Werten (z. B. fruchtsafthaltig)	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilisierung von Milchproteinen unter sauren Bedingungen • Keine Gelbildungs-Reaktion mit Calcium-Ionen

Ein wichtiger Markt für hochverestertes, niedrigviskoses Propylenglykolalginat besteht auch in der Anwendung als Bierschaumstabilisator. In den letzten Stufen des Brauprozesses wird PGA in kleinsten Mengen (40 – 100 ppm) dem Bier hinzugesetzt und interagiert mit den im Getränk vorliegenden Proteinen. Auf diese Weise wird die Auflösung des Bierschaumes durch Kontaminanten, wie z. B. Detergentien-Rückstände vom Waschen der Gläser, Fettsuren von aufgenommener Nahrung oder Lippenstift, verzögert (Firma Pronova Biopolymer, S. 18; King 1983, S. 178 f.).

Propylenglykolalginat hat zudem eine besonders günstige Auswirkung auf kalorienreduzierte Biere, in denen die Schaumbildung wegen des niedrigen Proteingehaltes besonders schwierig ist (King 1983, S. 178 f.)

Experimentelle Veranschaulichung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein zweiteiliger Versuch zur Verwendung von Propylenglykolalginat als Emulgator und Stabilisator für Salatdressings mit hohen Säure- oder Calcium-Gehalten konzipiert. Abbildung 30 a) zeigt einige Produktbeispiele, in denen PGA diese Funktion erfüllt.

In Experiment 12 a) wird aus gleichen Volumenteilen Speiseöl, Essig und Propylenglykolalginat-Lösung ($\rho^* = 30 \text{ g/L}$) durch Schütteln im Demonstrationsreagenzglas eine Salatsoße hergestellt und bezüglich Ihrer Stabilität mit einer Probe verglichen, die statt Algenpolysaccharid-Sol lediglich entionisiertes Wasser enthält. Um die Phasentrennung besser beobachten zu können, färbt man die Öl-Phase mit Sudanrot B an.

Während in der Vergleichsprobe ohne Emulgator schon nach wenigen Minuten die Trennung der Öl- und Wasser-Phase einsetzt und nach etwa 10 Minuten deutlich erkennbar ist, weist das PGA-haltige Dressing eine hohe Emulsionsstabilität auf. In Abbildung 30 b) wird das Ergebnis des ersten Versuchsteils präsentiert.

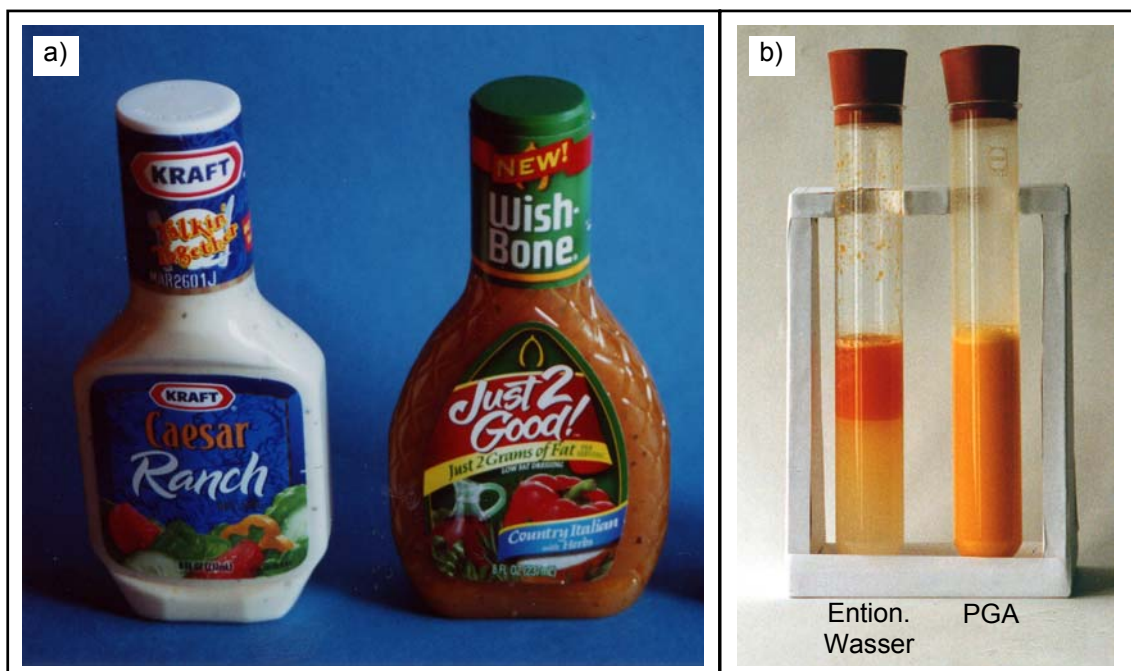


Abb. 30: Stabilisierung von sauren Salatdressings mit Propylenglykolalginat (E 405): a) Produktbeispiele aus den USA (Claußen/Marburger 2001, S. 20), b) selbst hergestellte Essig-Öl-Soßen aus Experiment 12 a): Vergleichsprobe mit entionisiertem Wasser (links) und mit PGA stabilisierter Ansatz (rechts); Anfärbung der Öl-Phasen mit Sudanrot B.

Im zweiten Versuchsteil (Experiment 12 b)) soll untersucht werden, ob es sich bei einem mit Propylenglykolalginat stabilisierten Salatdressing um eine O/W- oder eine W/O-Emulsion handelt. Zur Bestimmung des Emulsions-Typs bietet sich unter anderem die Leitfähigkeits-Methode an (Falbe/Regitz 1995 b, S. 1158 f.), die auf folgender Voraussetzung basiert: Im Falle einer O/W-Emulsion besteht die kontinuierliche Phase aus Wasser. Erhöht man nun die Ionen-Konzentration in der wässrigen Phase (z. B. durch NaCl-Zusatz), ist bei diesem Emulsions-Typ eine Steigerung der Leitfähigkeit zu erwarten. Bei W/O-Systemen hingegen, in denen kleine Wasser-Tröpfchen in Öl dispergiert sind, bleibt dieser Effekt aus, da sich das Salz nicht in der äußeren Phase löst.

In Experiment 12 b) werden in zwei Demonstrationsreagenzgläsern jeweils gleiche Volumina Essig, Speiseöl und Propylenglykolalginat-Lösung ($\rho^* = 30 \text{ g/L}$) durch Schütteln vermischt. Im ersten Ansatz verwendet man ein PGA-Sol ohne Natriumchlorid-Zusatz, während in der zweiten Probe eine gleichkonzentrierte Lösung des Alginsäure-Esters in Natriumchlorid-Lösung ($c = 0,5 \text{ mol/L}$) zum Einsatz kommt.

Für die Leitfähigkeitsmessung werden je 40 mL jeder Emulsion in ein 100-mL-Becherglas überführt. Mit Hilfe eines Leitfähigkeitsmessstabes bestimmt man dann in beiden Ansätzen die Stromstärke I (Messbereich 30 mA) bei einer angelegten Wechselspannung von $\sim U = 5$ bzw. 10 V (zur Versuchsanordnung vgl. Experiment 12 b)). Typische Messergebnisse werden in Tabelle 11 wiedergegeben.

Tab. 11: Ergebnisse der Leitfähigkeitsmessungen in mit Propylenglykolalginat emulgierten Salatdressings ohne und mit Natriumchlorid-Gehalt (vgl. auch Claußen/Marburger 2001, S. 50).

Einstellungen	Messreihe	I/mA	
		Emulsion ohne NaCl	Emulsion mit NaCl
$\sim U = 5 \text{ V}$ Messbereich: 30 mA	1	2	10
	2	1,5	10,5
	3	1,5	10
$\sim U = 10 \text{ V}$ Messbereich: 30 mA	1	4	19
	2	3	19,5
	3	4	22

Wie ersichtlich ist, misst man jeweils in den NaCl-haltigen Ansätzen deutlich höhere Leitfähigkeiten als in den Emulsionen ohne Zusatz des Salzes. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den mit Propylenglykolalginat stabilisierten Salatdressings um O/W-Emulsionen handelt.

2.6.3 Biotechnologie

2.6.3.1 Allgemeine Aspekte

Eine immer mehr an Bedeutung gewinnende Einsatzmöglichkeit der Alginate besteht im Bereich der Biotechnologie, wo diese Algenpolysaccharide unter Ausnutzung ihrer charakteristischen gelbildenden Eigenschaften zur Immobilisierung von Biokatalysatoren verwandt werden (vgl. z. B. Renn 1990, S. 8; Skjåk-Bræk/Espevik 1996, 19 f.; Skjåk-Bræk/ Martinsen 1991, S. 243 ff.; Smidsrød/Skjåk-Bræk 1990, S. 71 ff.).

Stoffumwandlungen unter Einsatz von Biokatalysatoren

Bei der Biotechnologie handelt es sich um eine anwendungsorientierte Wissenschaft, deren Hauptarbeitsziel darin besteht, Stoffwechselforgänge in großtechnischen Anlagen zu nutzen (Falbe/Regitz 1995 a, S. 429). Für biotechnologische Prozesse werden daher so genannte Biokatalysatoren eingesetzt. Darunter versteht man enzymatisch aktive Materialien, welche chemische Reaktionen katalysieren, die zwar naturgemäß in lebenden Organismen stattfinden, aber auch von Relevanz für industrielle Zwecke sein können. Der Begriff umfasst sowohl isolierte Enzyme und Zellorganelle als auch ganze Zellen von Mikroorganismen sowie höheren Pflanzen und Tieren (Dellweg/Schmid/Trommer 1992, S. 385; Prenosil et al. 1989, S. 2).

Stoffumwandlungen unter Einsatz von Biokatalysatoren, die auch als Biotransformationen bezeichnet werden, können herkömmlichen chemischen Prozessen aus den im Folgenden diskutierten Gründen überlegen sein (Falbe/Regitz 1995 a, S. 431; Skjåk-Bræk/Martinsen 1991, S. 219):

Entscheidende Vorteile enzymatisch katalysierter Reaktionen liegen darin, dass diese substrat- und regiospezifisch verlaufen und eine hohe Stereoselektivität aufweisen. Da vorwiegend unter milden Reaktionsbedingungen im wässrigen Milieu gearbeitet wird, besteht bei Biotransformationen zudem nicht die Gefahr der Zersetzung empfindlicher natürlicher Substrate oder als Edukte eingesetzter strukturverwandter Substanzen. Außerdem sind die Prozesse insgesamt als sehr umweltfreundlich einzustufen.

Werden für biotechnologische Stoffumwandlungen anstelle isolierter Enzyme Mikroorganismen bzw. ganze Zellen von höheren Pflanzen oder Tieren eingesetzt, so lassen sich unter Ausnutzung der in diesen enthaltenen Multienzymsysteme sogar komplexe, mehrstufige Reaktionen durchführen.

Trotz dieser Vorzüge finden Biokatalysatoren industriell nur in einer Reihe ausgewählter chemischer Prozesse Verwendung. Dies liegt vor allem darin begründet, dass die enzymatisch aktiven Materialien außerhalb ihres natürlichen Milieus relativ instabil sind, sich vom Reaktionsgemisch aufgrund ihres Vorliegens in gelöster oder suspendierter Form nur

schwer abtrennen lassen und folglich nur schwierig in kontinuierlichen Reaktoren eingesetzt werden können (Skjåk-Bræk/Martinsen 1991, S. 219).

Die im Vorangehenden geschilderten Aspekte werden in Tabelle 12 nochmals zusammengefasst.

Tab. 12: Vor- und Nachteile des Einsatzes von Biokatalysatoren (Falbe/Regitz 1995 a, S. 431; Skjåk-Bræk/Martinsen 1991, S. 219).

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> • Substrat- u. Regiospezifität • Stereoselektivität • Milde Reaktionsbedingungen • Ausnutzung von Multienzymkomplexen • Umweltfreundlichkeit 	<ul style="list-style-type: none"> • Instabilität außerhalb des natürlichen Mileus • Schlechte Abtrennbarkeit vom Reaktionsmedium • Verwendung in kontinuierlichen Prozessen schwierig

Immobilisierung von Biokatalysatoren

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, werden Biokatalysatoren immobilisiert, d. h. „[...] unter Erhalt ihrer Aktivität [...] mit chemischen und/oder physikalischen Methoden [...] in einem definierten Raumbereich so festgehalten [...], daß Mehrfachverwendung bzw. Dauereinsatz möglich wird [...]“ (Gomoll/Berger 1994, S. 449).

Wie die Übersichtsdarstellung in Abbildung 31 verdeutlicht, unterscheidet man grundsätzlich zwei verschiedene Kategorien von Immobilisierungsmethoden – chemische Bindung und physikalische Rückhaltung (Dellweg 1987, S. 241; Gomoll/Berger 1994, S. 451 ff.; Prenosil 1989, S. 4 ff.):

Bei der chemischen Fixierung werden die Biokatalysatoren adsorptiv, ionisch oder kovalent an einen Träger gebunden oder aber unter Einsatz bi- bzw. multifunktionaler Reagenzien untereinander oder gemeinsam mit den Teilchen einer nicht biologisch aktiven Trägersubstanz vernetzt.

Im Gegensatz dazu erfolgt im Falle der physikalischen Rückhaltung die Immobilisierung der Biokatalysatoren entweder durch Einschluss in eine Matrix, d. h. ein dreidimensionales Netzwerk aus gelbildenden Polymeren, oder durch Umhüllung mit einer aus dem Trägermaterial bestehenden Membran. Charakteristisch für die beiden letztgenannten Immobilisierungsmethoden ist die Tatsache, dass „[...] die Biokatalysatoren, abgesehen von [...] Wechselwirkungen [...] mit den einschließenden Materialien, in einem mehr oder weniger großen begrenzten Raum relativ frei vorliegen [...]“ (Gomoll/Berger 1994, S. 451).

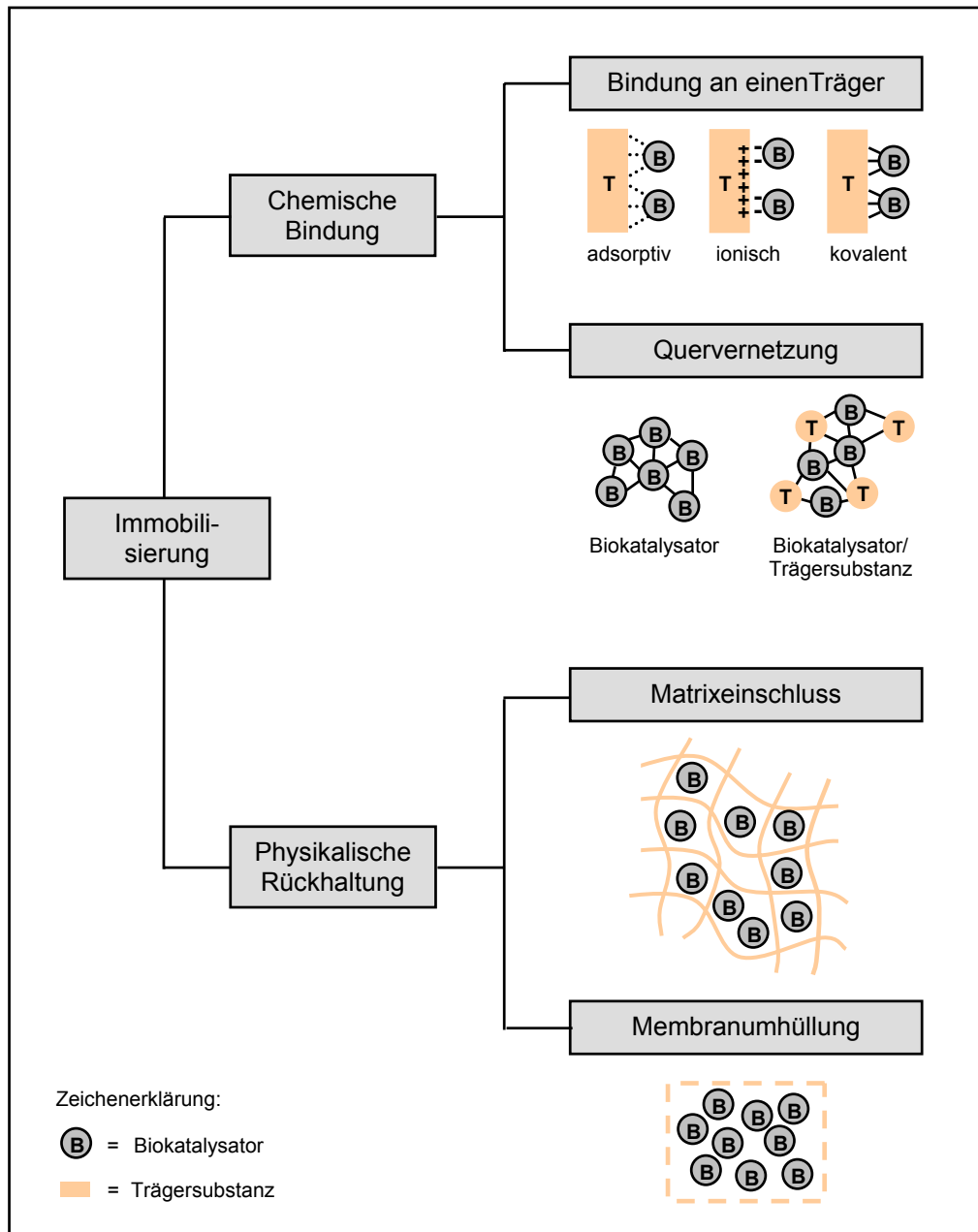


Abb. 31: Methoden der Immobilisierung von Biokatalysatoren (Dellweg 1987, S. 241; Gomoll/Berger 1994, S. 452; Hartmeier 1986, S. 15; verändert).

Als Immobilisierungsmaterial für den Matriceinschluss von lebenden Mikroorganismen sowie höheren Pflanzen- und Tierzellen haben sich in den letzten Jahren besonders die Gele bewährt, die Alginat-Polyanionen mit Calcium-Ionen bilden: „[...] entrapment of cells within [...] Ca^{2+} alginate has become the most widely used technique for immobilizing living cells [...]“ (Smidsrød/Skjåk-Bræk 1990, S. 71).

2.6.3.2 Matrixeinschluss von Zellen in Calciumalginat-Gel

Immobilisierung von Zellen in Calciumalginat

Die gängigste technisch angewandte Methode für den Einschluss von Zellen in Calciumalginat-Gel besteht in der Herstellung sphärischer Immobilisat-Partikel (engl. gel beads). Dabei wird nach dem im Folgenden vorgestellten Prinzip gearbeitet (vgl. u. a. Klein/Vorlop 1986, S. 375 f.; Klein/Wagner 1983, S. 34 f.; Mattiason 1983, S. 14 f.): Zunächst vermischt man eine Suspension der zu immobilisierenden Zellen gründlich mit einem im Autoklaven sterilisierten wässrigen Natriumalginat-Sol, dessen Massenkonzentration etwa $\rho^* = 20 - 40 \text{ g/L}$ beträgt. Die resultierende Mischung wird daraufhin tropfenweise in eine mäßig gerührte Calciumchlorid-Lösung ($c(\text{Ca}^{2+}) = 0,1 - 0,5 \text{ mol/L}$) eingebracht.

Im großtechnischen Maßstab kommt dazu eine Spezialapparatur zum Einsatz, mit deren Hilfe in kurzer Zeit große Mengen des kugelförmigen Immobilisats hergestellt werden können. Abbildung 32 verdeutlicht deren Funktionsweise: Die in einem Druckbehälter enthaltene Suspension von Zellen in Natriumalginatsol wird unter Anwendung eines Luftstroms (p_1) durch Kanülen in einen Tank mit Calciumchlorid-Lösung gepresst. Zur Regulierung des Durchmessers der Immobilisat-Kugeln dient eine zweite Pressluftzufuhr (p_2): Ist der hier eingesetzte Luftstrom stark, so werden die Tropfen der Natriumalginat-Zell-Mischung frühzeitig von den Kanülenspitzen abgeblasen und die resultierenden Immobilisat-Kugeln weisen eine geringe Größe auf (Klein/Vorlop 1986, S. 374).

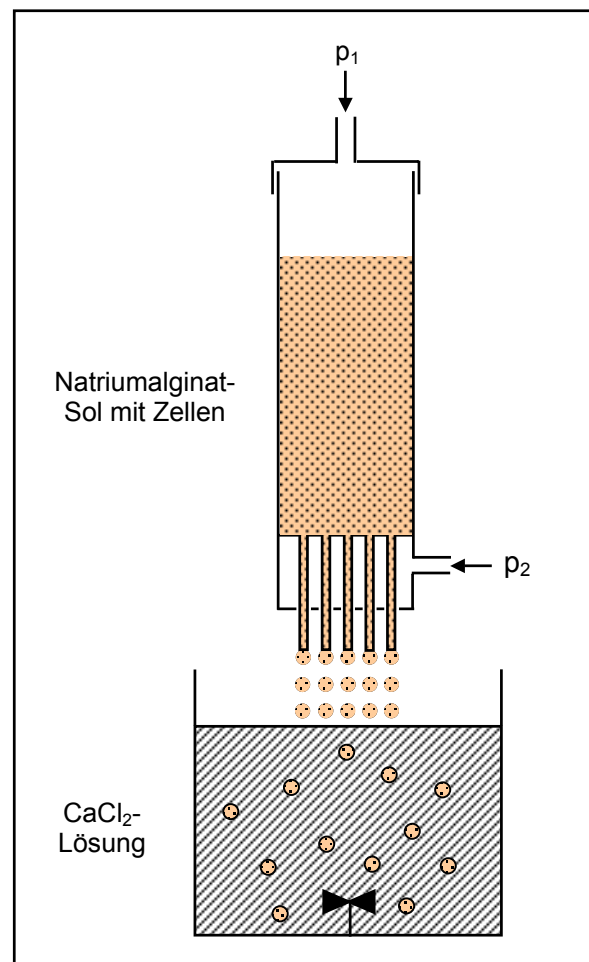


Abb. 32: Spezialapparatur zur Immobilisierung von Zellen in Calciumalginat-Gel (Klein/Vorlop 1986, S. 375; verändert).

Sobald ein Tropfen der Natriumalginat-Zell-Suspension in das Gelierbad eintaucht, bildet sich an seiner Oberfläche spontan eine dünne Hülle aus Calciumalginat-Gel. Um eine vollständige Aushärtung der Immobilisat-Kugeln herbeizuführen, belässt man diese in Abhängigkeit von den Konzentrationsverhältnissen noch etwa eine halbe bis zwei Stunden in der Calciumchlorid-Lösung. Während dieser Zeit diffundieren die Ca^{2+} -Ionen bis ins Zentrum der Immobilisat-Kugeln und induzieren auch dort die Assoziation der Alginat-Polyanionen zu einem dreidimensionalen Gelnetzwerk, in das die Zellen des Biokatalysators eingelagert werden. Abbildung 33 veranschaulicht die mit der Gelbildung verbundenen Vorgänge schematisch.

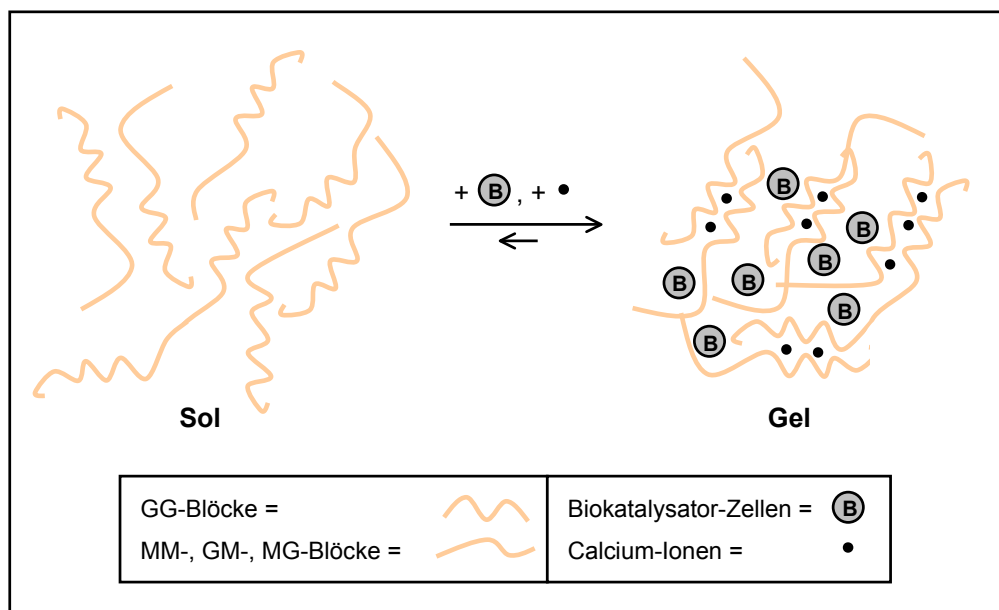


Abb. 33: Schematische Darstellung des mit der Immobilisierung von Biokatalysatoren in Calciumalginat verbundenen Gelbildungsprozesses (Scharf 1987, S. 37; verändert).

Eigenschaften der Immobilisate

Kugelförmige Immobilisate von Zellen in Calciumalginat-Gel haben sich in der Biotechnologie nicht nur aufgrund der Einfachheit ihrer Herstellung, sondern auch wegen weiterer charakteristischer Vorzüge durchgesetzt (vgl. auch Tabelle 13):

Im Vergleich zu anderen Immobilisierungsverfahren, wie z. B. der physikalischen Rückhaltung von Biokatalysatoren in Netzwerken aus synthetischen Polymeren, deren monomere Vorläufer giftig sind, handelt es sich bei dem Matrixeinschluss in Calciumalginat-Gel um eine extrem schonende Methode: Alginat selbst weist keine toxischen Eigenschaften auf, und die Immobilisierung lässt sich bei physiologischen pH-Werten, Raumtemperatur und ohne Verwendung aggressiver Reagenzien durchführen. Aus diesen Gründen können

auch empfindliche Zellen unter Erhalt ihrer Lebensfähigkeit in Calciumalginat-Kugeln immobilisiert werden (Hartmeier 1986, S. 39; Klein/Vorlop 1986, S. 373).

Das Gelnetzwerk, welches durch die Assoziation von Alginat-Polyanionen unter koordinativer Bindung von Calcium-Ionen gebildet wird, eignet sich aufgrund seiner Struktur besonders gut für den Einschluss von Mikroorganismen sowie Zellen höherer Tiere und Pflanzen. Das dreidimensionale Polysaccharid-Gerüst ist so engmaschig, dass die darin immobilisierten Biokatalysator-Zellen nur in geringem Maß ausgewaschen werden. Dadurch lassen sich Immobilisate mit hohen Zellbelastungen herstellen (Klein/Vorlop 1986, S. 374; Klein/Wagner 1983, S. 35).

Die Poren in Calciumalginat-Gelen sind mit Durchmessern, die in Abhängigkeit von der Herstellungsmethode zwischen 5 und 200 nm schwanken, aber zu weitlumig für einen vollständigen Matrixeinschluss großer Protein-Moleküle (Skjåk-Bræk/Martinsen 1991, S. 228, 237; Smidsrød/Skjåk-Bræk 1990, S. 72). Das Material ist somit für die Immobilisierung von Enzymen nur eingeschränkt geeignet, sofern diese nicht kovalent an das Polysaccharid gebunden werden (Büyükgüngör 1987, S. 60; Smidsrød/Skjåk-Bræk 1990, S. 72). Für eine detaillierte Auseinandersetzung mit dieser Problematik sei auf die Kapitel 2.6.3.4 und 2.6.3.6 des Theoretischen Teils verwiesen.

Bei Verwendung von Calciumalginat als Trägersubstanz für Immobilisierung von Mikroorganismen und ganzen Tier- und Pflanzen-Zellen wirkt sich die Größe der Poren allerdings dahingehend vorteilhaft aus, dass die Diffusion der an den Biotransformationen beteiligten Substrate und Reaktionsprodukte in der Gelmatrix kaum behindert wird (Smidsrød/Skjåk-Bræk 1990, S. 72, 75 f.).

Bezüglich ihrer Stabilität verfügen Calciumalginat-Immobilisate sowohl über charakteristische Stärken als auch über gewisse Schwächen:

Als vorteilhaft anzusehen ist die Tatsache, dass die Gele, welche von den Alginat-Polyanionen mit Calcium-Ionen gebildet werden, im Gegensatz zu denen anderer Algenpolysaccharide (vgl. z. B. κ - und ι -Carrageenan, Kapitel 3.3.2 des Theoretischen Teils) zwischen 0 und 100 °C keine Thermoreversibilität aufweisen und folglich in dem für Biotransformationen relevanten Temperaturbereich ohne Einschränkungen einsetzbar sind (Akin 1987, S. 329).

Die mechanische Stabilität der Immobilisate von Zellen in Calciumalginat ist als relativ gut einzuschätzen, wenn man diese nicht starken Belastungen durch hohe Rührgeschwindigkeiten aussetzt (Klein/Wagner 1983, S. 36). Die höchste Gelfestigkeit lässt sich erzielen, wenn für den Biokatalysator-Einschluss guluronatreiche Natriumalginat-Verbindungen verwandt werden (Smidsrød/Skjåk-Bræk 1990, S. 74).

Im Hinblick auf ihre chemische Stabilität weisen Immobilisate auf der Basis von Calciumalginat gewisse Schwachpunkte auf: Eine Schwierigkeit besteht darin, dass bei Präsenz von Anionen, die mit Ca^{2+} schwerlösliche Niederschläge oder Komplexe bilden (z. B.

Phosphat- und Citrat-Ionen), eine partielle Herauslösung der Erdalkalimetall-Kationen aus dem Polysaccharid-Netzwerk erfolgt, was mit einer Schwächung der Gelmatrix verbunden ist. Folglich sind in Calciumalginat eingeschlossene Zellen nicht in Puffer-Lösungen einsetzbar, die hohe Konzentrationen der genannten Anionen enthalten (Akin 1987, S. 329; Bucke 1987, S. 185; Mattiason 1983, S. 14; Smidsrød/Skjåk-Bræk 1990, S. 71 f.).

Problematisch können sich auch große Mengen von Kationen auswirken, die mit Alginat-Polyanionen keine Gele bilden (z. B. Na^+ , K^+ , NH_4^+ und Mg^{2+}): Sind diese in großem Überschuss vorhanden, kommt es durch Kationenaustauschreaktionen zur teilweisen Wiederauflösung des Calciumalginat-Gels (Klein/Vorlop 1986, S. 376; Smidsrød/Skjåk-Bræk 1990, S. 71, 75). Die damit im Zusammenhang stehenden chemischen Vorgänge wurden am Beispiel des Einflusses hoher Na^+ -Konzentrationen bereits in Kapitel 2.6.2.1 des Theoretischen Teils erläutert (vgl. Gleichung (13)).

Abhilfe gegen die Destabilisierung der Immobilisate kann in den meisten Fällen aber durch Anreicherung des Reaktionsmediums mit Calcium-Ionen geschaffen werden, sofern diese keinen hemmenden Einfluss auf die durchzuführende Biotransformation haben (Bucke 1987, S. 185; Smidsrød/Skjåk-Bræk 1990, S. 75). Wie Untersuchungen von Akin (1987, S. 329) ergeben haben, sind dafür bereits Ca^{2+} -Konzentrationen im Bereich von $c = 3 \text{ mmol/L}$ ausreichend.

Die Vor- und Nachteile von Calciumalginat-Immobilisaten werden in Tabelle 13 noch einmal zusammengefasst:

Tab. 13: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile von Calciumalginat-Gel als Matrix für die Zell-Immobilisierung (Akin 1987, S. 329; Bucke 1987, S. 185; Hartmeier 1986, S. 39; Klein/Vorlop 1986, S. 373 f.; Klein/Wagner 1983, S. 35; Mattiason 1983, S. 14; Smidsrød/Skjåk-Bræk 1990, S. 71 ff.).

Immobilisierung von Zellen in Calciumalginat-Gel	
Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> • Einfache und zellschonende Herstellungsmethode Physiologischer pH, Raumtemperatur, milde Reagenzien • Günstige Porengröße Wenig Auswaschung von Zellen, gute Permeabilität für Substrate und Produkte • Thermoirreversibles Gel Einsetzbarkeit bei höheren Temperaturen 	<ul style="list-style-type: none"> • Eingeschränkte mechanische Belastbarkeit Verwendung nur bei niedrigen Rührgeschwindigkeiten • Chemische Labilität Schwächung des Gels durch Anionen, die mit Ca^{2+}-Ionen schwerlösliche Niederschläge oder Komplexe bilden (z. B. Phosphat, Citrat)

Anwendungsmöglichkeiten der Immobilisate

Unter Berücksichtigung der im Vorangehenden angesprochenen Einschränkungen ist Calciumalginat-Gel als Matrix für die Immobilisierung verschiedenartiger Mikroorganismen-, Pflanzen- und Tier-Zellen geeignet und wird unter anderem für die in Tabelle 14 aufgeführten Zwecke eingesetzt:

Tab. 14: Ausgewählte Einsatzmöglichkeiten für in Calciumalginat-Gel immobilisierte Biokatalysatoren (Skjåk-Bræk/Espevik 1996, S. 20; Skjåk-Bræk/Martinsen 1991, S. 242 ff.; verändert).

Immobilisierte Biokatalysatoren	Verwendungszweck
<u>Bakterien</u> <i>Erwina rhapontici</i> <i>Pseudomonas denitricans</i>	Produktion des Zuckeraustauschstoffes Isomaltulose Trinkwasser-Aufbereitung
<u>Algen</u> <i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Botryococcus braunii</i>	Glycerin-Produktion Darstellung von Kohlenwasserstoffen
<u>Pilze</u> <i>Claviceps purpurea</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (z. T. coimmobilisiert mit Enzymen)	Alkaloid- und Ergotoxin-Darstellung Herstellung von Penicillin Produktion von Ethanol aus Glucose und anderen verwertbaren Substraten Herstellung von Schaumweinen
<u>Pflanzen-Zellen</u> <i>Chatharanthus roseus</i>	Darstellung von Alkaloiden
<u>Säugetier-Zellen</u> <i>Langerhanssche Inseln</i> <i>Hepatocyten</i>	Insulin-Produktion Entgiftung von Blut

Aus dem großen Spektrum der biotechnologischen Anwendungen von Calciumalginat-Immobilisaten wurde für diese Arbeit exemplarisch die Einsatzmöglichkeit immobilisierter *Saccharomyces cerevisiae* für die fermentative Ethanol-Gewinnung und Schaumwein-Herstellung ausgewählt. Hefe-Zellen dieser Spezies sind uns aus dem Alltagsleben bekannt, da sie in Form von Back-, Wein-, Bier- und Brennereihefe für die Herstellung klassischer Gärungsprodukte verwandt werden (Hartmeier 1986, S. 164; Weber 1993, S. 305).

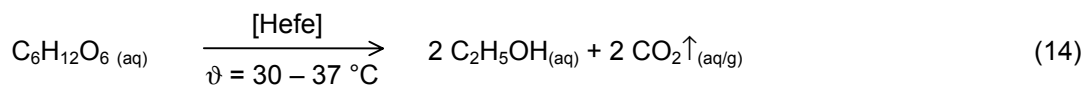
2.6.3.3 Ethanol-Produktion mit immobilisierter Hefe

Einsatz von Calciumalginat-Hefe-Kugeln

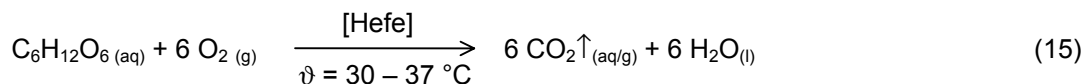
In Japan wird Ethanol bereits seit 1983 im halbindustriellen Maßstab unter Einsatz kugelförmiger Calciumalginat-Hefe-Immobilisate in Fließbettreaktoren produziert (Gomoll/Berger 1994, S. 488; Nagashima et al. 1987, S. 394 ff.; Renn 1990, S. 8; Skjåk-Bræk/Martinsen 1991, S. 242 ff.).

Um deutlich zu machen, warum für diesen Zweck die Verwendung immobilisierter Hefezellen vorteilhaft ist, müssen zunächst die mit der ethanolischen Gärung im Zusammenhang stehenden chemischen Vorgänge und prozesstechnischen Aspekte in ihren Grundzügen erläutert werden (Falbe/Regitz 1995 a, S. 354 f.; Falbe/Regitz 1995 b, S. 1244 f.; Falbe/Regitz 1995 c, S. 1752 f., 2332; Hartmeier 1986, S. 74 ff.; Kosaric/Duvnjak 1987 a, S. 598 ff.; Kosaric/Duvnjak 1987 b, S. 609 ff.):

Die in *Saccharomyces cerevisiae* vorhandenen Enzyme katalysieren unter anaeroben Bedingungen die Umsetzung von Glucose zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid. Die dabei im Einzelnen ablaufenden Stoffwechselforgänge sollen an dieser Stelle nicht diskutiert werden, lassen sich aber formal mit der von Gay-Lussac aufgestellten Gärungsgleichung zusammenfassen:



In Gegenwart von Luftsauerstoff wird Glucose hingegen von *Saccharomyces cerevisiae* zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut. Gleichung (15) verdeutlicht diese Reaktion schematisch:



Großtechnisch wird der Hauptteil des durch Gärung erzeugten Ethanols auch heute noch durch sogenannte Batch-Fermentation hergestellt (Kosaric/Duvnjak 1987 b, S. 609). Wie aus Abbildung 34 a) hervorgeht, befinden sich bei diesem Prozess die als Biokatalysatoren eingesetzten Hefe-Zellen zusammen mit der Lösung des Substrats (Glucose oder andere metabolisierbare Kohlenhydrate) in einem Rührreaktor.

Die Batch-Methode ist aber mit einer Reihe von Problemen behaftet: Zum einen erfordert es einen hohen technischen Aufwand, nach erfolgter Reaktion das Gärungsprodukt Ethanol von der nicht umgesetzten Substrat-Lösung abzutrennen, ohne dass die Hefe-Zellen dabei Schaden nehmen. Die Möglichkeit, den Biokatalysator mehrfach einzusetzen, ist somit stark eingeschränkt.

Zum anderen besteht bei der Batch-Fermentation eine Schwierigkeit darin, dass *Saccharomyces cerevisiae* durch zu hohe Alkohol-Gehalte im Reaktionsansatz in ihrer Gärleistung gehemmt und langfristig sogar irreversibel geschädigt wird (Kosaric/Duvnjak 1987 a, S. 603 f.). Ethanol-Konzentrationen von mehr als 110 g/L bewirken bei den meisten Hefe-Stämmen die Einstellung der Fermentation und des Wachstums (Kosaric 2002).

Dieses prozesstechnische Problem lässt sich durch Anwendung kontinuierlicher Fermentationsverfahren umgehen:

Wie Abbildung 34 b) verdeutlicht, setzt man hier verschiedene Typen von Durchflussreaktoren ein, die jedoch allesamt dadurch gekennzeichnet sind, dass ihnen ständig Substrat-Lösung zugeführt und mit Ethanol angereichertes Reaktionsmedium entnommen wird.

In kontinuierlichen Systemen ist allerdings die Verwendung freier Hefe-Zellen dahingehend problematisch, dass sich nur durch aufwendige technische Maßnahmen Vorkehrungen gegen das Auswaschen der Biokatalysatoren treffen lassen. Hier kann z. B. durch den Einsatz in Calciumalginat-Gel immobilisierter *Saccharomyces cerevisiae* Abhilfe geschaffen werden, da die im Vergleich zu suspendierten Hefe-Zellen großen Immobilisat-Partikel sehr leicht mechanisch mit Sieben im Reaktor zurückhaltbar sind.

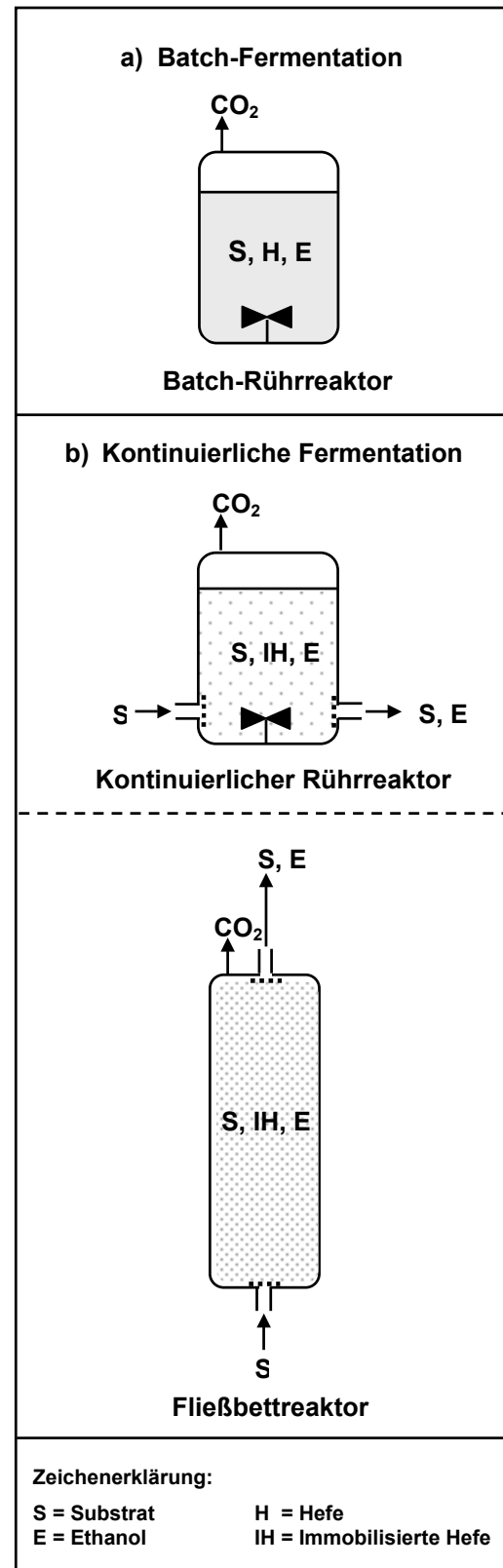


Abb. 34: Großtechnische Produktion von Ethanol durch Gärung: Ausgewählte Verfahren und dafür eingesetzte Reaktortypen (Falbe/Regitz 1995 c, S. 2332; Hartmeier 1986, S. 74 ff.; verändert).

Durch Fermentation mit immobilisierter *Saccharomyces cerevisiae* in kontinuierlichen Rührreaktoren (vgl. Abbildung. 34 b)) lassen sich Ethanol-Produktionsraten erzielen, die mehr als zehnmal so hoch sind wie diejenigen, welche man unter Einsatz freier Hefe-Zellen in Batch-Verfahren erreicht (Kosaric/Duvnjak 1987 b, S. 615). In finanzieller Hinsicht günstig wirkt sich außerdem die Tatsache aus, dass immobilisierte Hefe-Zellen wiederholt einsetzbar sind.

Eine weitere Steigerung des Substrat-Umsatzes lässt sich durch Verwendung sogenannter Fließbettreaktoren (vgl. Abbildung 34 b)) bewirken: Anders als bei kontinuierlichen Rührreaktoren liegen hier die kugelförmigen Partikel des Hefe-Immobilisats nicht im Reaktionsmedium suspendiert vor, sondern werden locker in den Reaktor gepackt und mit der Substrat-Lösung umspült, die man von unten nach oben durch das Fließbett führt (Hartmeier 1986, S. 75 ff., 79 ff.). Folglich sind die pro Volumeneinheit einsetzbaren Biokatalysator-Mengen wesentlich größer als im Falle von kontinuierlichen Rührreaktoren.

Experimentelle Veranschaulichung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Versuche konzipiert, mit denen sich die Herstellung und die Anwendung von Calciumalginat-Hefe-Immobilisaten für die biotechnologische Ethanol-Gewinnung auf einfache Weise verdeutlichen lassen:

In Experiment 13 werden zunächst – in Analogie zur großtechnischen Verfahrensweise – kugelförmige Immobilisate von Hefe-Zellen in Calciumalginat-Gel hergestellt. Dazu tropft man eine Suspension von frischer Backhefe in Natriumalginat-Sol ($p^* = 20 \text{ g/L}$) in mäßig gerührte Calciumchlorid-Lösung ($c = 0,2 \text{ mol/L}$) ein. Als Eintropfvorrichtungen für den Labormaßstab haben sich Einwegspritzen bewährt, die bei Bedarf mit Kanülen versehen werden können (vgl. u. a. Bucke 1987, S. 182; Hobein/Lutz 1987, S. 24; Mattiason 1983, S. 14). In Experiment 13 kommt eine vom Stempel befreite Wund- und Blasenspritze (100 mL) zum Einsatz, auf die zur Verringerung des Auslaufdurchmessers ein der Spritze beiliegender Adapter aufgesteckt wird. Aus dieser Spritze treten ohne äußere Einwirkung in regelmäßigen Abständen die Tropfen der Natriumalginat-Hefe-Mischung aus (vgl. Abbildung 35).

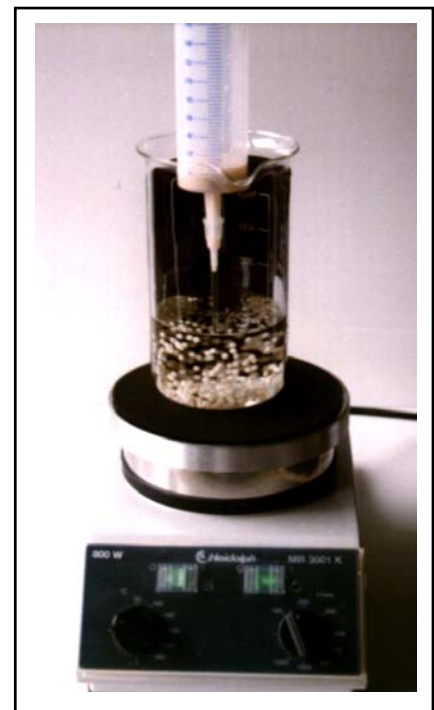


Abb. 35: Matrixeinschluss von Hefe-Zellen in Calciumalginat-Gel (Experiment 13).

Bei Eintropfen des Natriumalginat-Hefe-Gemisches in die Calciumchlorid-Lösung die Gelbildungsreaktion zwischen Alginat-Polyanionen und Calcium-Ionen ein. Die Hefe-Zellen werden in der entstehenden Gelmatrix aus Calciumalginat eingeschlossen (vgl. Abbildung 33).

Die Eigenschaften der in Experiment 13 hergestellten Calciumalginat-Hefe-Immobilisate werden in der Arbeit in drei Folgeversuchen näher untersucht:

Experiment 14 bietet die Möglichkeit, die Gärfähigkeit der immobilisierten Hefe-Zellen qualitativ nachzuweisen. Dazu wird ein Reaktionsansatz mit Immobilisat-Kugeln in wässriger, neutraler Glucose-Lösung ($c = 0,45 \text{ mol/L}$), die zur Stabilisierung des Calciumalginat-Gels zusätzlich Ca^{2+} -Ionen enthält ($c = 0,04 \text{ mol/L}$), auf $\vartheta_{\text{konst.}} = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert.

Die Versuchsanordnung wurde so gewählt, dass man die Veränderungen an den immobilisierten Hefe-Zellen sehr gut beobachten kann (vgl. Experimenteller Teil): Vor Einsetzen der Reaktion liegen die Kugeln am Boden des Reagenzglas. Sobald aber im Rahmen des Gärvorganges die Bildung von Kohlenstoffdioxid einsetzt, beginnen die Immobilisat-Partikel aufgrund im Gel eingeschlossener Gasblasen an die Flüssigkeitsoberfläche zu steigen. Das bei der Fermentation des Monosaccharids entstehende Kohlenstoffdioxid wird zusätzlich durch Einleitung in Calciumhydroxid-Lösung nachgewiesen. Hier ist schon nach etwa 15 – 20 Minuten eine deutliche Trübung durch Calciumcarbonat zu beobachten.

Die in der Arbeit beschriebenen Folgeversuche (Experimente 15 und 16) haben das Ziel, das Fermentationsverhalten von Calciumalginat-Hefe-Immobilisaten und freien Hefe-Zellen genauer zu untersuchen:

Experiment 15 ermöglicht einen quantitativen Vergleich der Gärleistungen immobilisierter und nicht immobilisierter Hefe-Zellen. Zunächst ermittelt man die Fermentationsleistung der ausgehärteten und mit entionisiertem Wasser gewaschenen Calciumalginat-Hefe-Kugeln aus Experiment 13. Dabei kommt als Substrat wiederum eine auf $\vartheta_{\text{konst.}} = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ temperierte Glucose-Lösung zum Einsatz, die zur Stabilisierung des Immobilisats zusätzlich Calcium-Ionen enthält.

Die Bestimmung der Gärleistung erfolgt über das gebildete CO_2 -Volumen (zur Versuchsanordnung vgl. Experimenteller Teil, Kapitel 2.1.4.2). Dazu rührt man den temperierten Reaktionsansatz mit den immobilisierten Hefe-Zellen etwa 30 Minuten mit mäßiger Geschwindigkeit und liest so lange in 30-Sekunden-Abständen das Volumen des in einem Kolbenprober aufgefangenen Gases ab, bis ein Gesamtvolumen von 100 mL erreicht wird.

Um nachzuweisen, dass es sich bei dem gebildeten Gas um Kohlenstoffdioxid handelt, leitet man anschließend 40 mL des im Kolbenprober aufgefangenen Gasgemisches in ein mit Kalkwasser gefülltes Saugrohr ein. Unter diesen Bedingungen bildet sich ein weißer CaCO_3 -Niederschlag, der sich deutlich von der leichten Trübung unterscheidet, die bei Einleitung von 40 mL Luft in 3 mL gesättigte Ca(OH)_2 -Lösung zu beobachten ist.

Zum Vergleich wird anschließend auf analoge Weise die CO_2 -Produktionsrate einer Hefe-Suspension bestimmt, deren Biokatalysator-Gehalt mit dem des Immobilisats übereinstimmt.

Die experimentell bestimmten Gärleistungen immobilisierter und nicht immobilisierter Hefe-Zellen werden einander in Abbildung 36 a) gegenübergestellt:

Wie ersichtlich ist, erfolgt bei kontinuierlichem Rühren die Vergärung der Glucose in dem Ansatz mit immobilisierter Hefe anfangs mit etwas geringerer Geschwindigkeit als in der Reaktionsmischung mit der Hefe-Suspension. Dies liegt darin begründet, dass die aus Calciumalginat-Gel bestehende Matrix, in der die Hefe-Zellen eingeschlossen sind, für die an der enzymatischen Reaktion beteiligten Substrate und Produkte eine Diffusionsbarriere darstellt, die zunächst überwunden werden muss. Abbildung 36 b) veranschaulicht diesen Sachverhalt schematisch.

Jedoch haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, dass die Diffusionsraten von Glucose und Ethanol in Matrices aus Calciumalginat-Gel bei idealen Konzentrationsverhältnissen nur um etwa 10 % kleiner sind als in Wasser (Smidsrød/Skjåk-Bræk 1990, S. 72, 75 f.; Skjåk-Bræk/Martinsen 1991, S. 237).

Die Unterschiede in den CO_2 -Produktionsraten nivellieren sich aber weitgehend, wenn auch im Inneren der Calciumalginat-Hefe-Immobilisate genügend hohe Substrat-Konzentrationen erreicht werden. In Abbildung 36 a) wird dies darin deutlich, dass die Gärkurven der immobilisierten und nicht immobilisierten Hefe mit fortschreitender Reaktionszeit annähernd gleiche Steigungen aufweisen.

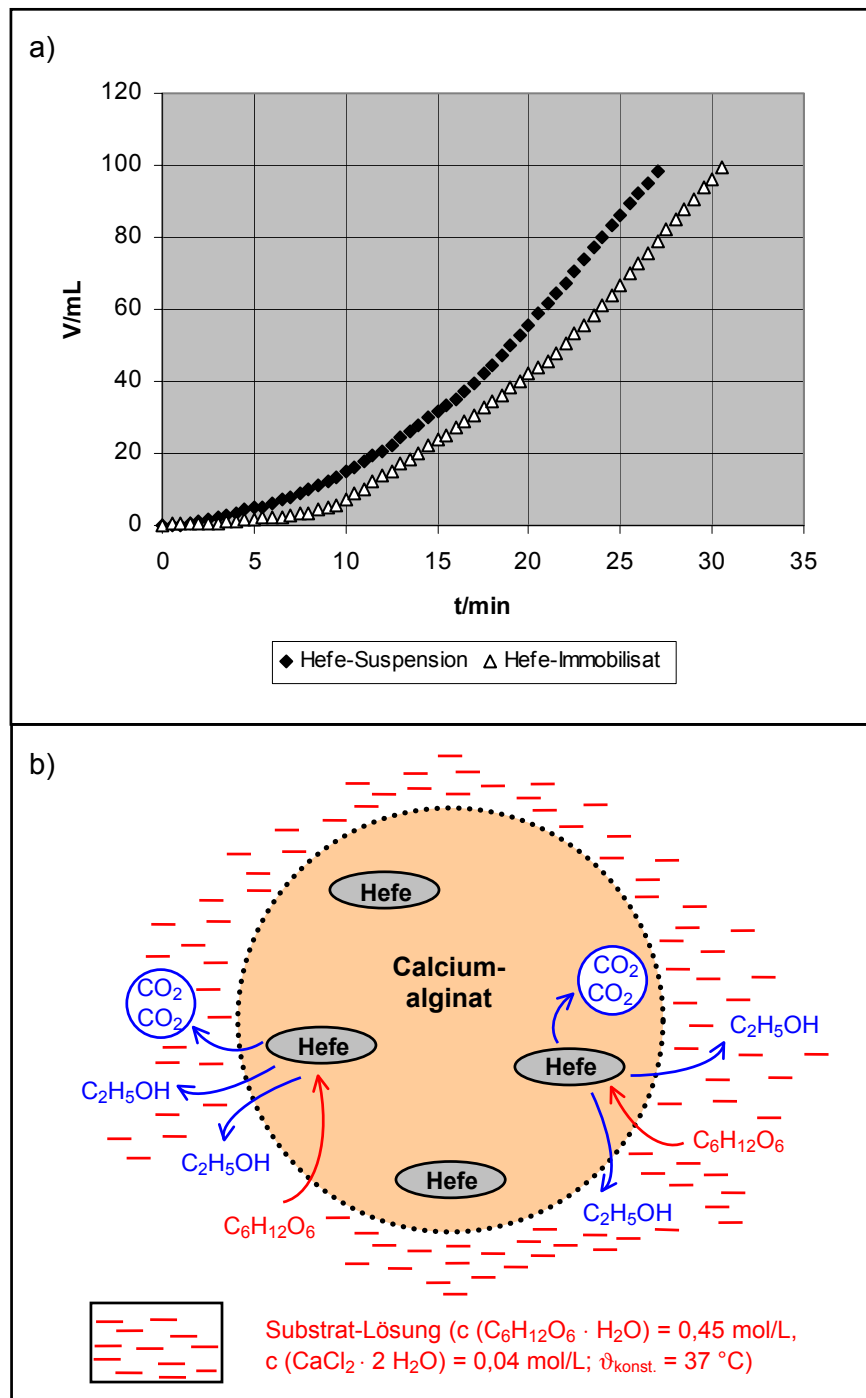


Abb. 36: Quantitativer Vergleich der Gärleistungen immobilisierter und nicht immobilisierter Hefe-Zellen (Experiment 15):

- Volumen des gebildeten Kohlenstoffdioxids in Abhängigkeit von der Zeit;
- Schematische Darstellung der Vorgänge in einer Calcium-alginat-Hefe-Kugel (aus Hobein/Lutz 1987, S. 23); verändert).

Zum Abschluss des Experimentes wird die Abtrennbarkeit der Calciumalginat-Hefe-Immobilisate bzw. der freien Hefe-Zellen vom Reaktionsmedium untersucht:

Im Falle der Immobilisat-Kugeln erhält man bei Einsatz eines Haushaltssiebes ein praktisch klares und – zumindest augenscheinlich – hefefreies Filtrat. Dieser Befund lässt sich durch mikroskopische Untersuchungen bestätigen, bei denen man im Filtrat keine Hefe-Zellen, sondern nur kleine Partikel aus Calciumalginat-Gel vorfindet, die vermutlich durch mechanische Belastung beim Rühren des Reaktionsgemisches abgetrennt werden.

Im Gegensatz dazu kann man freie Hefe-Zellen auch mittels Faltenfilter nicht vollständig von der Substrat-Lösung abtrennen. Das erhaltene Filtrat ist stark getrübt.

Diese Versuchsergebnisse verdeutlichen die gute Eignung von Calciumalginat-Hefe-Immobilisaten für die biotechnologische Ethanol-Produktion mit kontinuierlicher Reaktionsführung, bei der die einfache Abtrennbarkeit und Wiederverwendbarkeit der eingesetzten Biokatalysatoren entscheidende Voraussetzungen für die Praktikabilität und Rentabilität des Verfahrens darstellen.

Wenn der Vergleich der Gäraktivitäten freier und immobilisierter Hefe-Zellen lediglich halbquantitativ erfolgen soll, kann Experiment 16 als apparativ weniger aufwändige Variante eingesetzt werden (zur Versuchsanordnung vgl. Experimenteller Teil): Hier wird das bei der Gärung entwickelte Kohlenstoffdioxid pneumatisch in 100-mL-Messzylindern aufgefangen. Das gebildete CO_2 lässt sich dann in den vollständig mit Gas gefüllten Zylindern qualitativ durch Einspritzen von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösung nachweisen.

Im Falle der halbquantitativen Abschätzung der Gärleistungen erfolgt das Ablesen der Messwerte lediglich in einminütigen Abständen und ist mit größeren Ungenauigkeiten verbunden als bei der Kolbenprober-Methode. So sind z. B. am 100-mL-Messzylinder Volumina unterhalb 4 mL wegen fehlender Graduierung nicht bestimmbar. Die erhaltenen experimentellen Ergebnisse sind jedoch durchaus brauchbar und lassen sich – wie für Experiment 15 beschrieben – auch graphisch auswerten (vgl. Abbildung 37).

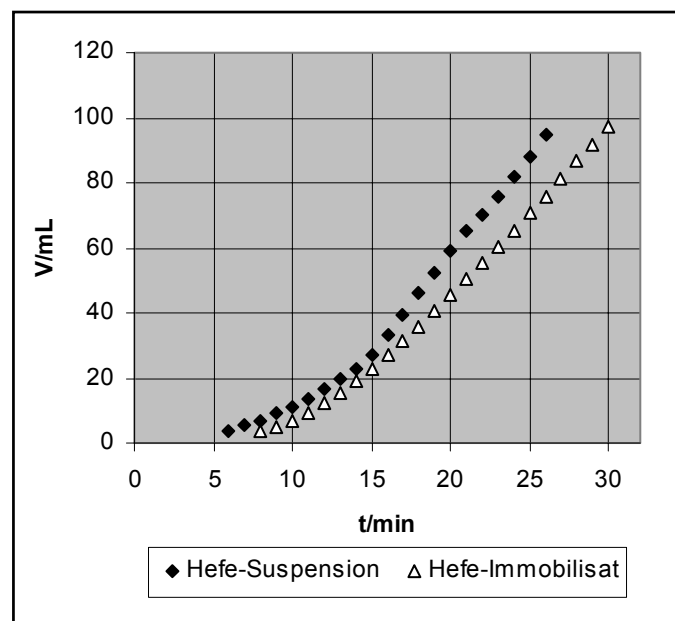


Abb. 37: Versuchsergebnisse des halbquantitativen Vergleiches der Gärleistungen in Calciumalginat-Gel immobilisierter und freier Hefe-Zellen (Experiment 16).

Sowohl bei der quantitativen als auch bei der halbquantitativen Bestimmung der Gärleistungen immobilisierter und nicht immobilisierter Hefe-Zellen sollte beachtet werden, dass die Absolutwerte für die ermittelten CO_2 -Volumina Schwankungen unterliegen können. Als Einflussgrößen sind insbesondere die Sorte, das Alter, die Temperatur und der Quellungsgrad der eingesetzten frischen Backhefe sowie die Rührgeschwindigkeit des Magnetrührers zu nennen. Um aussagekräftige experimentelle Daten zu erhalten, ist es daher sehr wichtig, die Bedingungen in den vergleichenden Versuchen mit immobilisierter und nicht immobilisierter Hefe möglichst konstant zu halten. So muss z. B. die eingesetzte frische Backhefe durchgängig im Kühlschrank gelagert werden oder aber vor Experimentierbeginn auf Zimmertemperatur gebracht werden, damit die Ausgangstemperatur der Hefe-Zellen für alle Versuche übereinstimmt.

Versuche zum Vergleich der Gärleistungen von freien bzw. in einer Matrix aus Calciumalginate eingeschlossenen Hefe-Zellen finden sich auch in Hartmeier (1986, S. 164 ff.) sowie Lutz/Müller (1992, S. 21) und dienen als Ausgangsbasis für die Entwicklung der Experimente 15 und 16. Es wurden jedoch einige entscheidende Veränderungen vorgenommen, die im Folgenden kurz zu diskutieren sind:

Hartmeier (1986, S. 166) verwendet für die Erwärmung und Durchmischung der Reaktionsansätze in Bruträumen platzierte Schüttelmaschinen. Da man aber nicht davon ausgehen kann, dass eine derartige Ausstattung in Schulen und Universitätspraktika vorhanden ist, wurden stattdessen für die Experimente 15 und 16 heizbare Magnetrührer mit Kontaktthermometern eingesetzt.

Des Weiteren schlägt Hartmeier (1986, S. 166) in seinem quantitativen Versuch vor, das im Fermentationsprozess entstehende Kohlenstoffdioxid pneumatisch aufzufangen. Aufgrund der Tatsache, dass bei einer solchen Versuchsanordnung jedoch kleine Volumenveränderungen nicht ablesbar sind, müssen die Gärleistungen der immobilisiert bzw. in Suspension vorliegenden Hefe-Zellen während eines Zeitraums von mehreren Stunden verfolgt werden, um ein bezüglich der Anzahl der Messwerte mit Abbildung 36 a) vergleichbares Volumen-Zeit-Diagramm zu erhalten. Diese Vorgehensweise ist jedoch im schulischen Chemieunterricht zeitlich kaum realisierbar. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Experiment 15 stellt folglich eine deutlich zeitökonomischere, aber keinesfalls weniger exakte oder aussagekräftige Variante des bereits existenten quantitativen Verfahrens dar, die zusätzlich einen qualitativen Nachweis des entstehenden Kohlenstoffdioxids ermöglicht.

Der bereits in der Literatur beschriebene halbquantitative Versuch von Lutz/Müller (1992, S. 21) untersucht – anders als Experiment 16 – zusätzlich den Effekt der Durchmischung des Reaktionsgemisches auf die CO_2 -Freisetzung. Hier werden die in den beiden Ansätzen gebildeten Gasvolumina nur jeweils zweimal nach dreißigminütiger Reaktionszeit mit Rühren sowie weiterer halbstündiger Fermentation bei abgeschaltetem Magnetrührer

pneumatisch bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hingegen ein halbquantitativer Versuch konzipiert, mit dem sich ähnliche Volumen-Zeit-Diagramme erstellen lassen wie bei quantitativer Verfahrensweise, jedoch mit deutlich geringerem apparativem Aufwand. Zudem wurde eine Möglichkeit entwickelt, auch pneumatisch aufgefangenes Kohlenstoffdioxid qualitativ nachzuweisen.

Optimierung der Ethanol-Produktion mit alternativen Immobilisat-Formen

Obwohl durch Einsatz kugelförmiger Calciumalginat-Hefe-Immobilisate in Fließbettreaktoren sehr hohe Ethanol-Produktionsraten erzielt werden können, bringt auch diese Anwendungsform immobilisierter Zellen gewisse Nachteile mit sich (Johansen/Flink 1986, S. 121, 123):

Durch die Packung der Calciumalginat-Kugeln im Reaktor wird das Entweichen von Kohlenstoffdioxid erschwert, welches im Rahmen der alkoholischen Gärung gebildet wird. Die zwischen den Immobilisat-Partikeln zurückgehaltenen CO₂-Blasen wirken sich störend auf die Produktionsleistung aus, weil sie den Kontakt der im Gel eingeschlossenen Hefe-Zellen mit der Substrat-Lösung behindern. Eine weitere ungünstige Folge des Gasrückstaus im Reaktor besteht darin, dass die Calciumalginat-Hefe-Immobilisate durch den sich aufbauenden hohen Druck relativ großen mechanischen Belastungen ausgesetzt werden. Schließlich können auch durch Einschluss von CO₂-Blasen im Kugellinneren irreversible Schäden an den Immobilisat-Partikeln hervorgerufen werden. Unter diesen Bedingungen tendieren die Calciumalginat-Immobilisate dazu, in zwei Hälften zu zerbrechen.

Aufgrund der im Vorangehenden geschilderten Schwierigkeiten gibt es Bestrebungen, das Reaktor-Design für die Ethanol-Produktion mit immobilisierten Hefe-Zellen zu optimieren. So entwickelten beispielsweise Johansen und Flint (1986, S. 121 ff.) eine Methode, mit der man Calciumalginat-Hefe-Immobilisate nach dem Prinzip der internen Gelbildung (engl. internal gelation) in beliebige Formen bringen kann. Auf dieser Grundlage wurde ein Modellreaktor konzipiert, mit dem die Probleme der CO₂-Rückhaltung umgangen werden sollten.

Für die Herstellung von Calciumalginat-Hefe-Immobilisaten durch interne Gelbildung wird zunächst die Lösung eines guluronatreichen Natriumalginats mit einer wässrigen Aufschlammung von Hefe-Zellen vermischt. Um die Gelierung der Algenpolysaccharid-Zell-Masse herbeizuführen, versetzt man diese im nächsten Schritt mit einer Calciumcitrat-Suspension und schließlich mit einer wässrigen Lösung von D-Gluconsäure-5-lacton (= D-Gluconsäure- δ -lacton). Nach gründlicher Durchmischung wird die noch flüssige Masse in den in Abbildung 38 dargestellten Modellreaktor eingebracht, in dem sie zwei Stunden zum Aushärten verbleibt (Johansen/Flint 1986, S. 122).

In dem zylinderförmigen Reaktor mit einem Durchmesser von 2,6 cm und einer Länge von 12 cm sind in hexagonalem Muster 0,4 cm dicke Metallstäbe angeordnet, die nach erfolgter Gelbildung entfernt werden. Auf diese Weise entstehen im Calciumalginat-Hefe-Immobilisat Kanäle, die mit Substrat-Lösung durchspült werden können. Die Kanäle ermöglichen auch das problemlose Entweichen von CO₂-Blasen (Johansen/Flint 1986, S. 122 ff.).

Mit der internen Gelbildung sind die im Folgenden diskutierten chemischen Reaktionen verknüpft (Falbe/Regitz 1995 b, S. 1599; Smidsrød/Draget 1996, S. 10):

Im wässrigen Milieu hydrolysiert D-Gluconsäure-5-lacton gemäß Gleichung (16) langsam zu D-Gluconsäure. Durch die saure Reaktion der entstandenen Zuckersäure erniedrigt sich der pH-Wert im Reaktionsmedium (Gleichung (17)) und es kommt zu einer partiellen Auflösung des in Wasser schwerlöslichen Calciumcitrats (Gleichung (18)). Die dabei freigesetzten Ca²⁺-Ionen induzieren allmählich die Bildung eines Calciumalginat-Gels, in das die Hefe-Zellen räumlich eingeschlossen werden (Gleichung (19)).

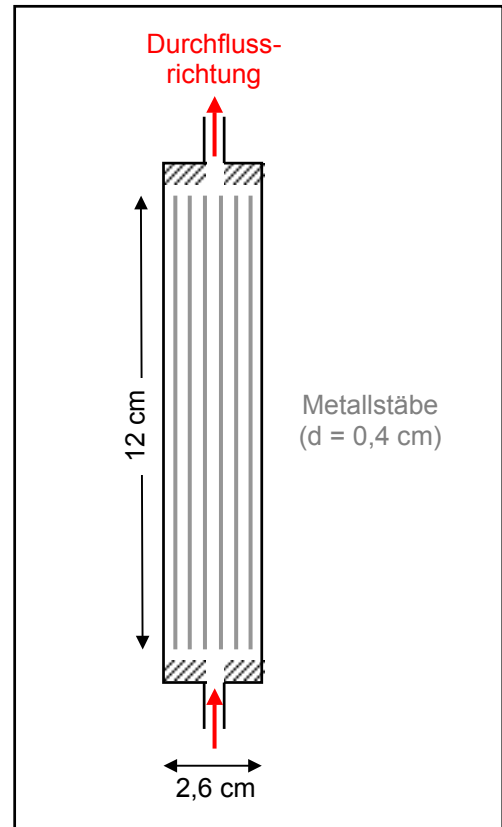
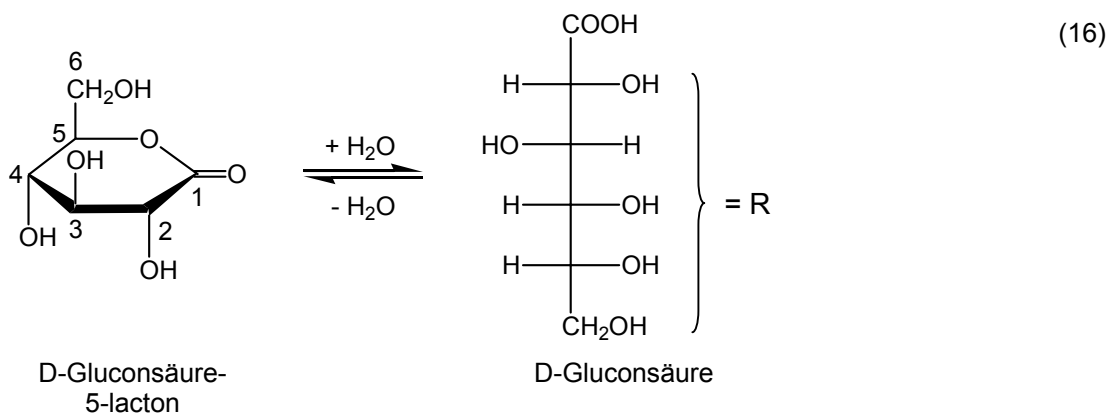
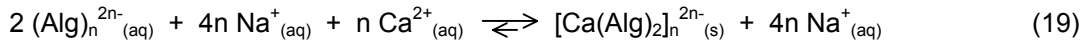
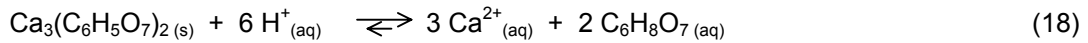


Abb. 38: Reaktor für die Ethanol-Produktion mit einem nach der internen Gelbildungsmethode hergestellten Calciumalginat-Hefe-Immobilisat (Johansen/Flint 1986, S. 122 ff.; verändert).





Calciumalginat-
Gel

Der beschriebene Modellreaktor wurde von Johansen und Flint (1986, S. 121 ff.) während eines Zeitraumes von 111 Tagen mit kontinuierlicher Prozessführung betrieben und wies wegen der begünstigten CO_2 -Freisetzung durch die Gelkanäle eine hohe Stabilität auf. Bei nachträglicher Untersuchung des Gelblocks wurden in den Kanalwänden Verdichtungen von Hefe-Zellen festgestellt.

Experimentelle Veranschaulichung

In dieser Arbeit wurde ein Versuch entwickelt, mit dem auf einfache Weise ein zylinderförmiges Calciumalginat-Hefe-Immobilisat nach der internen Geliermethode hergestellt und auf seine Gärfähigkeit mit Glucose als Substrat untersucht werden kann (vgl. Experiment 17 a) und b)).

Wie Abbildung 39 a) verdeutlicht, dient als Form für den Gelzylinder mit kanalartigen Hohlräumen ein Demonstrationsreagenzglas, in das sieben durch Korkstopfen fixierte Glasstäbe eingebracht werden.

Nach Aushärtung des Immobilisates lässt sich die Glas-Kork-Konstruktion komplett aus dem Reagenzglas entfernen und man erhält nach Herausziehen der Glasstäbe das in Abbildung 39 b) dargestellte Immobilisat.

Im zweiten Teil des Experimentes wird das Calciumalginat-Hefe-Immobilisat mit kanalförmigen Hohlräumen bei $\vartheta_{\text{konst.}} = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ auf seine Gärleistung untersucht. Als Substrat kommt dabei eine Glucose-Monohydrat-Lösung ($\rho^* = 75 \text{ g/L}$) zum Einsatz.

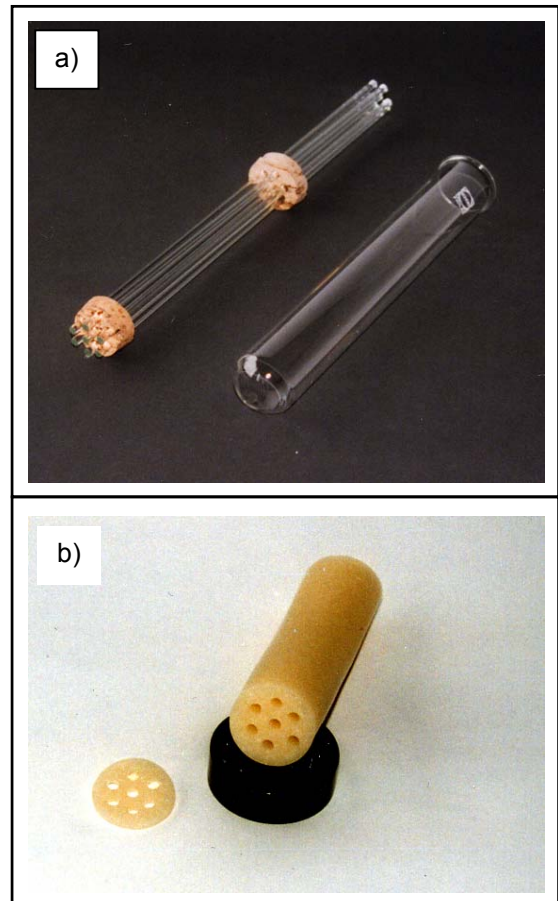


Abb. 39: Herstellung eines Calciumalginat-Hefe-Immobilisates nach der internen Gelbildungsmethode Johansen und Flint (1986, S. 121 ff.) (Experiment 17 a)): a) Modellreaktor, b) erhaltener Gelblock (rechts) und davon durch Horizontalschnitt abgetrennte Scheibe (links), in der die Kanäle sichtbar werden.

Das Volumen des während des Fermentationsprozesses gebildeten Kohlenstoffdioxids wird in einminütigen Abständen an einem Kolbenprober abgelesen (zum Versuchsaufbau vgl. Experimenteller Teil, Kapitel 2.1.4.2).

Der qualitative Nachweis des Gases kann in Analogie zu Experiment 15 durchgeführt werden.

Typische Ergebnisse des Fermentationstests mit dem nach der internen Gelbildungsmethode hergestellten Immobilisat werden in Abbildung 40 in Form eines Volumen-Zeit-Diagramms wiedergegeben.

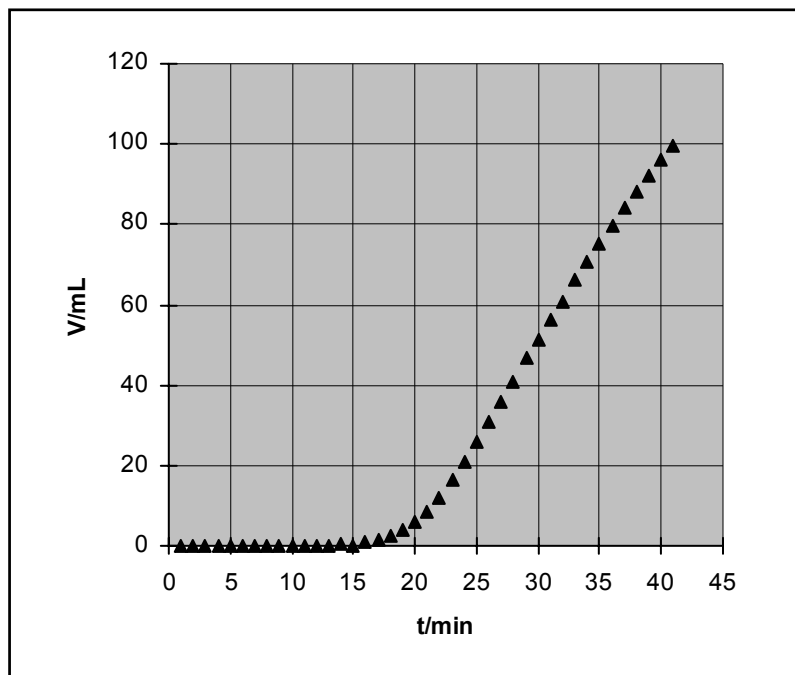


Abb. 40: Bestimmung der Gärleistung eines nach der internen Geliermethode hergestellten Calciumalginat-Hefe-Immobilisates (Experiment 17): Abhängigkeit des gebildeten CO₂-Volumens von der Zeit.

2.6.3.4 Gewinnung von Ethanol aus Abfallstoffen mit coimmobilisierter Hefe

Im Vorangehenden wurden die theoretischen Aspekte der Anwendung von Calciumalginat-Hefe-Immobilisaten für die großtechnische Produktion von Ethanol erläutert und mit Hilfe von Grundlagenexperimenten veranschaulicht. Die Gewinnung von Gärungsalkohol mit immobilisierten Biokatalysatoren kann aber industriell nur unter der Bedingung rentabel erfolgen, dass als Substrate möglichst kostengünstige Kohlenhydrate eingesetzt werden.

Im Kontext der Verwendung von Calciumalginat als Immobilisierungsmatrix für *Saccharomyces cerevisiae* (vgl. Tabelle 14) wird daher unter anderem auch die Möglichkeit untersucht, das in Molke enthaltene Disaccharid Lactose (D-Galactose/D-Glucose) zu Ethanol zu vergären (Büyükgüngör 1987, S. 60 ff.; Gomoll/Berger 1994, S. 489; Hägerdal 1980, S. 611 ff.; Roukas/Lazarides 1991, S. 15 ff.). Dies hat folgende Hintergründe:

In der milchverarbeitenden Industrie fallen als Nebenprodukt weltweit etwa 70 Millionen Tonnen Molke pro Jahr an, für deren sinnvolle Verwertung bis heute noch keine adäquate Lösung gefunden wurde. Ungeachtet der Tatsache, dass Molke aufgrund ihres Gehaltes an ernährungsphysiologisch wertvollen Proteinen (0,8 – 1,5 %) und Lactose (4,5 – 5,5 %) eigentlich eine durchaus wertvolle Rohstoffquelle darstellt, werden international immer noch erhebliche Mengen ungenutzt verworfen. Der in den Molkeabfällen enthaltene Milchzucker führt zu einer Erhöhung des Biologischen Sauerstoffbedarfes (BSB) der Gewässer, wodurch nicht zu unterschätzende Umweltbelastungen entstehen (Maiorella/Castillo 1984, S. 157; Ruttloff 1994, S. 770; Sprössler/Plainer 1983, S. 93).

Eine gängige, aber ökonomisch unbefriedigende Verwendungsmöglichkeit für die produzierten Abfälle besteht in der Herstellung von Molkekonzentraten und -pulvern, die als Tierfutter dienen bzw. nach weiterer Aufbereitung in geringfügigem Umfang in der Pharma- und Lebensmittelindustrie zum Einsatz kommen (Ruttloff 1994, S. 770; Sprössler/Plainer 1983, S. 93; Wenck/Maerz 1988, S. 36).

Durch die Nutzbarmachung von Molke als Ausgangsmaterial für die Ethanol-Gewinnung unter Einsatz immobilisierter Hefe-Zellen würde sich folglich eine interessante biotechnologische Verwertungsalternative für dieses Abfallprodukt eröffnen, die im Folgenden näher betrachtet werden soll:

Saccharomyces cerevisiae verfügt nicht über das lactosespaltende Enzym β -Galactosidase (EC 3.2.1.23) (IUBMB 1992) und ist folglich nicht in der Lage, den in Molke enthaltenen Milchzucker zu Ethanol umzusetzen. Daher wurde für die Produktion des Alkohols aus diesem Substrat zunächst die Verwendung von Mikroorganismen in Betracht gezogen, die das Disaccharid Lactose metabolisieren können. Dazu gehören beispielsweise

Hefen wie *Kluyveromyces fragilis* und *Kluyveromyces marxianus* (Marwaha/Kennedy 1984, S. 18; Roukas/Lazarides 1991, S. 15).

Experimentelle Studien haben jedoch gezeigt, dass in Calciumalginat-Gel eingeschlossene Zellen von *Kluyveromyces fragilis* über niedrigere Gäraktivitäten verfügen als kombinierte Immobilisate von β -Galactosidase und *Saccharomyces cerevisiae* in diesem Trägermaterial (Hahn-Hägerdal 1985; zitiert in Roukas/Lazarides 1991, S. 15).

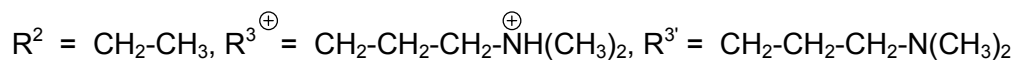
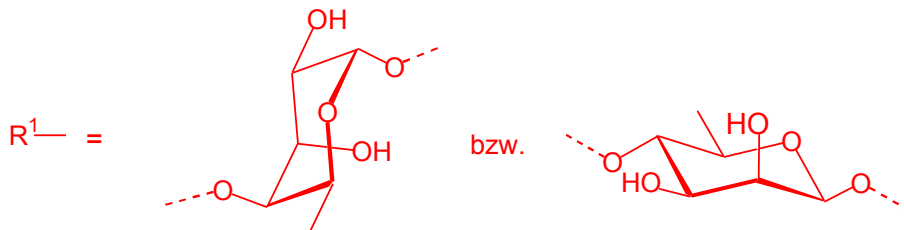
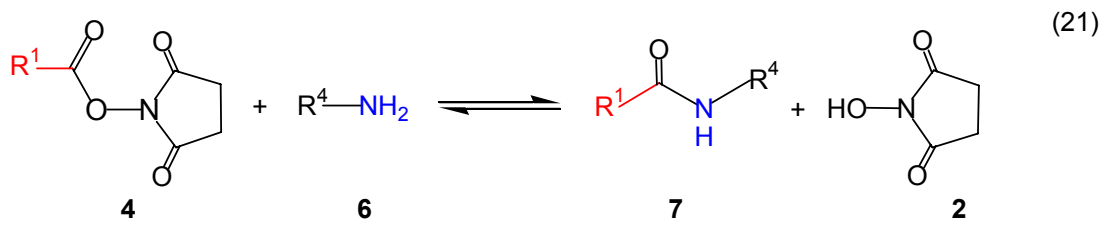
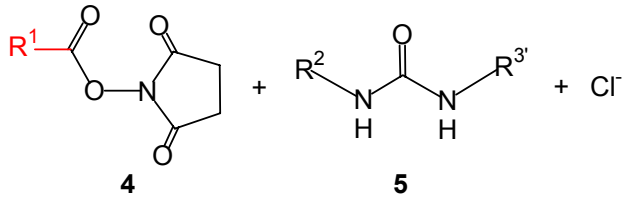
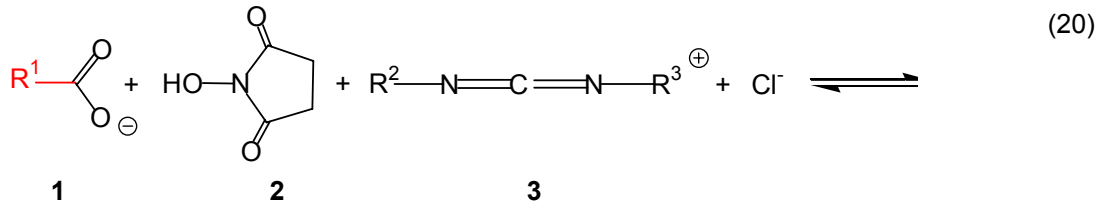
Aufgrund dieser Tatsache hat sich das Forschungsinteresse insbesondere auf die Entwicklung von Verfahren konzentriert, mit denen sich die beiden letztgenannten Biokatalysatoren möglichst effizient in Calciumalginat coimmobilisieren und daraufhin zur Ethanolgewinnung aus Molke einsetzen lassen (vgl. z. B. Büyükgüngör 1987, S. 60 ff.; Hägerdal 1980, S. 611 ff.; Roukas/Lazarides 1991, S. 15 ff.).

Wie bereits zuvor angedeutet wurde (vgl. Kapitel 2.6.3.2 des Theoretischen Teils), lassen sich Enzyme lediglich teilweise in einer Matrix aus Calciumalginat-Gel einschließen, weil diese über so große Poren verfügt, dass die Protein-Moleküle darin nur schwer quantitativ physikalisch zurückgehalten werden können. Nach einem von Hahn-Hägerdal (1984, S. 771 ff.) entwickelten Coimmobilisierungsverfahren lässt sich dieses Problem dadurch umgehen, dass man zunächst das Enzym kovalent an das Algenpolysaccharid bindet.

In Analogie zu einer gängigen Methode der Peptid-Synthese erfolgt dabei die Knüpfung von Peptid-Bindungen zwischen den Carboxylat-Funktionen der Alginat-Polyanionen und freien Amino-Gruppen der β -Galactosidase. Die dabei stattfindenden chemischen Reaktionen können schematisch durch die umseitig angeführten Gleichungen (20) und (21) beschrieben werden (Breitmaier/Jung 1983, S. 405):

Alginat (**1**) reagiert zunächst mit N-Hydroxysuccinimid (**2**) und dem als Hydrochlorid vorliegenden N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (**3**), wobei als Produkte ein N-Hydroxysuccinimidester (**4**) sowie ein Harnstoff-Derivat (**5**) entstehen (Gleichung (20)).

Durch den nucleophilen Angriff einer freien Amino-Gruppe der β -Galactosidase (**6**) an dem positivierten Carboxy-C-Atom des Aktivesters (**4**) erfolgt dann die Bildung einer Peptid-Bindung, über welche das Enzym kovalent an das Algenpolysaccharid gekuppelt wird (**7**). Im Zuge dieses Reaktionsschrittes wird N-Hydroxysuccinimid (**2**) wieder freigesetzt. (Gleichung (21)).



Experimentelle Veranschaulichung

Zur Coimmobilisierung von Hefe und β -Galactosidase in Calciumalginat-Gel wurden zwei Versuche entwickelt:

In Experiment 18 a) werden zwei verschiedene Coimmobilisate von β -Galactosidase und frischer Backhefe in Calciumalginat hergestellt und anschließend in einem Fermentationsexperiment unter Verwendung von Sauermolke als Substrat hinsichtlich ihrer Gärleistungen verglichen. Die kovalente Kopplung des Enzyms erfolgt dabei nach der zuvor beschriebenen Methode von Hahn-Hägerdal (1984, S. 771 ff.).

Um zu überprüfen, mit welchem Alginat-Typ die Enzym-Bindung effektiver vonstatten geht, stellt man in Experiment 18 a) zwei verschiedene Kupplungsansätze her, von denen der eine Natriumalginat mit hohem Guluronat-Anteil und der andere eine mannuronatreiche Variante des Algenpolysaccharids enthält.

Die beiden Ansätze werden nach zwanzig- bis vierundzwanzigstündiger Reaktionszeit im Kühlschrank jeweils mit gleichen Mengen eines guluronatreichen Alginat-Sols sowie einer Suspension von *Saccharomyces cerevisiae* in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH = 5,0) verrührt. Die resultierenden Mischungen tropft man gemäß der zuvor erläuterten Vorgehensweise mit Hilfe von 100-mL-Spritzen in mit Natriumacetat und Essigsäure auf den gleichen pH-Wert gepufferte Calciumchlorid-Lösungen ein (vgl. Abbildung 35). Dabei erfolgt die bereits bekannte Assoziation der Polyguluronat-Ketten durch Chelatisierung von Calcium-Ionen (vgl. Kapitel 2.3.2). Wie Abbildung 41 veranschaulicht, sind auch die Alginat-Sequenzen, an welche zuvor das Enzym β -Galactosidase kovalent gebunden wurde, an der Bildung des dreidimensionalen Polysaccharid-Netzwerkes beteiligt. In die entstehende Gelmatrix aus Calciumalginat werden zudem die Hefe-Zellen eingeschlossen.

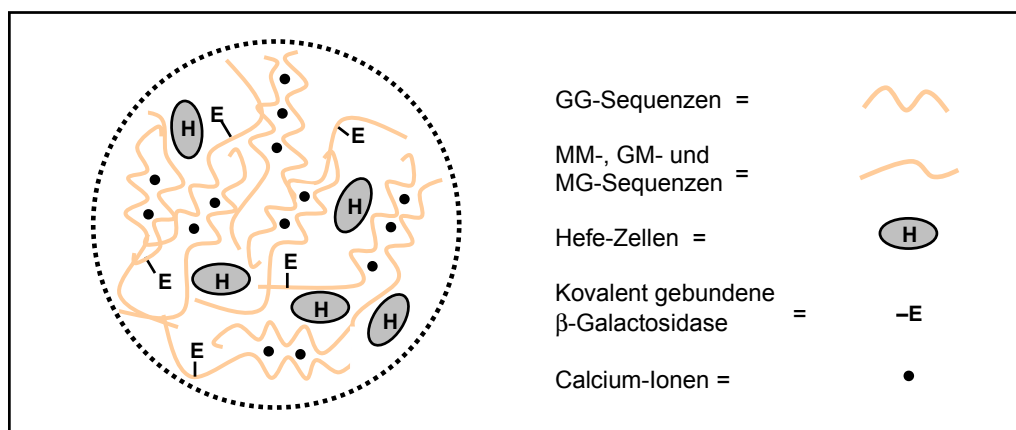


Abb. 41: Prinzip der Coimmobilisierung von β -Galactosidase und *Saccharomyces cerevisiae* in Calciumalginat (Hahn-Hägerdal 1983, S. 89; verändert).

In Experiment 18 b) werden die beiden hergestellten Coimmobilisate einem Gärtest mit Molke unterzogen. Dafür verwendet man eine Apparatur, die hinsichtlich ihres Aufbaus derjenigen entspricht, welche bei der Bestimmung der Fermentationsleistungen freier und in Calciumalginat eingeschlossener Hefe-Zellen zum Einsatz kommt (zur Versuchsanordnung vgl. Experimenteller Teil).

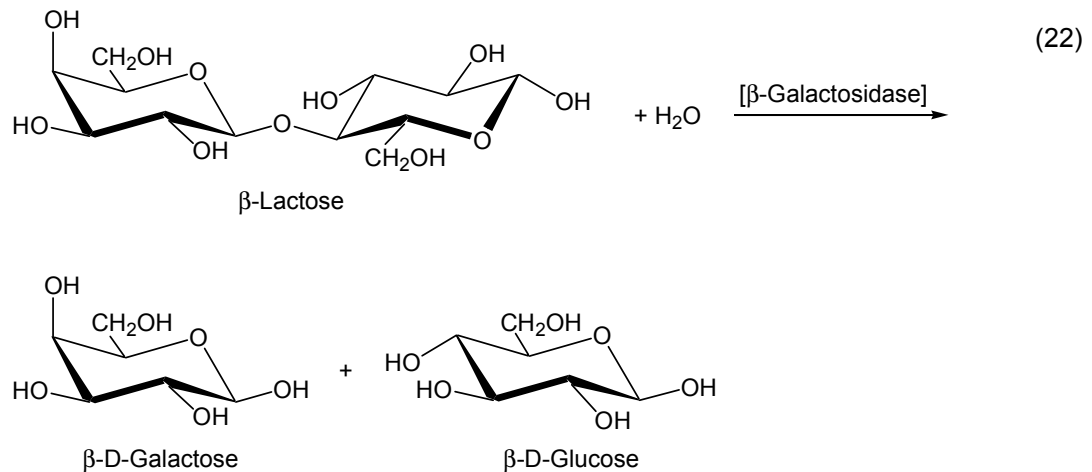
Mit dem Versuch soll qualitativ nachgewiesen werden, dass die Immobilisate, in welchen β -Galactosidase und *Saccharomyces cerevisiae* kombiniert vorliegen, die in Molke enthaltene Lactose unter Bildung von CO_2 umzusetzen vermögen. Eine Versuchsanordnung, mit deren Hilfe sich das entstehende Gasvolumen quantitativ bestimmen lässt, wurde aus dem Grunde gewählt, dass man auf diese Weise gleichzeitig vergleichende Aussagen über die Gärleistungen der beiden unterschiedlich angesetzten Coimmobilisate machen kann.

Die als Substrat einzusetzende Sauermolke wird zunächst mit Natronlauge auf das pH-Optimum des coimmobilisierten Enzyms eingestellt, welches für die im Versuch verwendete β -Galactosidase aus dem Schimmelpilz *Aspergillus oryzae* bei $\text{pH} = 5,0$ liegt (Greenberg/Mahoney 1981, S. 4) und anschließend auf $\vartheta_{\text{konst.}} = 37\text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmt. Obwohl sich mit dem Enzym eigentlich in einem Temperaturbereich zwischen 50 und $55\text{ }^\circ\text{C}$ höchste Umsatzraten erzielen lassen (Greenberg/Mahoney 1981, S. 4), muss man aufgrund der Präsenz von *Saccharomyces cerevisiae* in einem niedriger temperierten Reaktionsmedium arbeiten, da die Hefe-Zellen ansonsten eine irreversible Schädigung erfahren würden (Falbe/Regitz 1995 b, S. 1245).

Zunächst wird nun die Gärleistung des mit guluronatreichem Natriumalginat-Sol hergestellten Coimmobilisats bestimmt: Dazu liest man das Volumen des gebildeten Kohlenstoffdioxids während einer Reaktionszeit von 40 Minuten in Minutenabständen am Kolbenprober ab. Der Reaktionsansatz ist dabei kontinuierlich mit mittlerer Geschwindigkeit zu rühren. Nach Abbruch der Messung wird nachgewiesen, dass es sich bei dem gebildeten Gas um Kohlenstoffdioxid handelt. Zu diesem Zweck leitet man 40 mL des im Kolbenprober aufgefangenen Gasgemisches in ein mit 5 mL Calciumhydroxid-Lösung gefülltes Saugrohr ein. Während unter den genannten Bedingungen ein deutlich erkennbarer weißer Niederschlag von Calciumcarbonat entsteht, führt die Einleitung von 40 mL Luft in die gleiche Menge Kalkwasser nur zu einer sehr schwachen Trübung. Anschließend wird die Gärleistung des mit mannuronatreichem Natriumalginat hergestellten Coimmobilisats auf analoge Weise bestimmt.

Mit dem Gärexperiment sind die im Folgenden diskutierten chemischen Reaktionen verknüpft:

Zunächst wird die in Molke enthaltene Lactose unter katalytischer Wirkung der immobilisierten β -Galactosidase hydrolytisch in D-Galactose und D-Glucose gespalten. Das Disaccharid liegt in wässriger Lösung bei $\vartheta = 20\text{ }^\circ\text{C}$ sowohl in der α -Form (β -D-Galactopyranosyl- α -D-glucopyranose) als auch in der β -Form (β -D-Galactopyranosyl- β -D-glucopyranose) vor. Da das Gleichgewichtsverhältnis zwischen den beiden Anomeren unter diesen Bedingungen $\alpha : \beta = 1 : 1,68$ beträgt (Belitz/Grosch 1987, S. 392; Swaisgood 1985, S. 801), sei der Vorgang der enzymatischen Hydrolyse in Gleichung (22) schematisch am Beispiel der β -Lactose beschrieben (Labahn-Lucius 1990, S. 109; Shukla 1975, S. 332, 337; Vollhardt 1990, S. 1096):



Die gebildeten Monosaccharide stehen jeweils in Mutarotationsgleichgewichten mit ihren α -Anomeren.

Die bei der Enzymreaktion entstandene Glucose kann nun von der im Coimmobilisat vorhandenen *Saccharomyces cerevisiae* unter anaeroben Bedingungen zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid vergoren werden (vgl. Gleichung (14)). Den qualitativen CO_2 -Nachweis führt man wie üblich durch.

Bei Präadaption an Galactose als Substrat sind die Hefe-Zellen sogar in der Lage, auch diese Hexose zu fermentieren (Hägerdal 1980, S. 613).

Die in Experiment 18 b) ermittelten Gärleistungen der Coimmobilisate auf der Basis guluronat- bzw. mannuronatreicher Kupplungsansätze werden einander in Abbildung 42 jeweils in Form von Volumen-Zeit-Diagrammen gegenübergestellt.

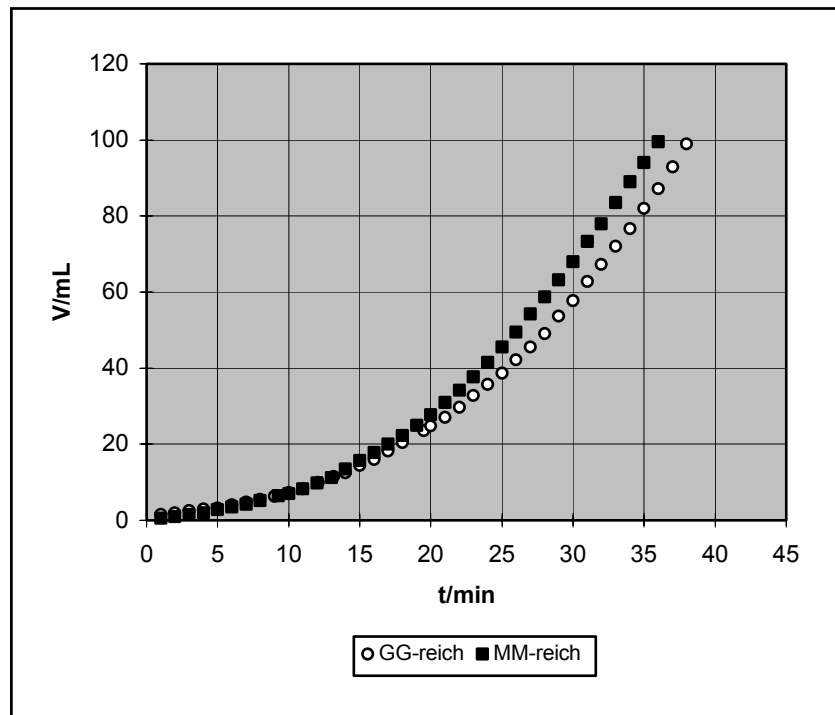


Abb. 42: Gärleistungen zweier Coimmobilisate von β -Galactosidase und Hefe in Calciumalginat unter Verwendung von Molke (pH = 5,0) als Substrat (Experiment 18 b)): Das Volumen des bei der Fermentation entstandenen Kohlenstoffdioxids ist in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Das Enzym wurde in einem Ansatz kovalent an ein guluronatreiches, in dem anderen an ein mannuronatreiches Alginat gekuppelt.

Wie ersichtlich ist, weisen die Immobilisate leichte Unterschiede in ihren Gärleistungen auf. Im Falle des Coimmobilisats, in welchem die verwendete β -Galactosidase kovalent an ein Alginat mit hohem Guluronat-Anteil gebunden wurde, liegt die CO_2 -Produktionsrate anfangs etwas niedriger als bei dem entsprechenden Ansatz auf der Basis des mannuronatreichen Algenpolysaccharids. Ab einer Reaktionszeit von etwa 30 Minuten vergären aber beide Coimmobilisate mit annähernd gleicher Geschwindigkeit.

Dieses Ergebnis ließ sich sowohl nach eintägiger Aufbewahrung der Coimmobilisate in mit Natriumacetat und Essigsäure gepufferten Calciumchlorid-Lösungen als auch in einem Kontrollexperiment reproduzieren.

Für diesen Befund gibt es zwei denkbare Erklärungen: Unter Umständen wird die β -Galactosidase besser kovalent an das mannuronatreiche Alginat gebunden, da hier aus sterischen Gründen die Carboxylat-Gruppe für die Bildung des Aktivesters und den sich anschließenden nucleophilen Angriff der freien Amino-Gruppe des Enzyms leichter zugänglich ist (vgl. Konformationen der Alginat-Blocktypen in Kapitel 2.2.1 des Theoretischen Teils sowie Gleichungen (20) und (21)). Eine effektivere Kupplung wäre folglich mit geringeren Enzym-Verlusten im Gelierbad verbunden, die vor allem dadurch entstehen, dass nicht gebundene Protein-Moleküle aus der Gelmatrix herausdiffundieren. Das resultieren-

de Coimmobilisat müsste also über einen höheren Enzym-Gehalt und somit auch über eine gesteigerte Gäraktivität verfügen.

Da sich allerdings die CO₂-Produktionsraten mit fortschreitender Reaktionszeit praktisch nivellieren, ist es wahrscheinlicher, dass das Coimmobilisat auf der Basis des mannuro-natreichen Algenpolysaccharids anfangs aus dem Grunde eine höhere Fermentationsaktivität zeigt, dass dessen Gelmatrix wegen des höheren Anteils an MM-Sequenzen, die sich bekanntlich nicht durch Einlagerung von Ca²⁺-Ionen assoziieren (vgl. Kapitel 2.3.2 des Theoretischen Teils), weitporiger ist. Die Diffusionseinschränkungen für die an den enzymatischen Reaktionen beteiligten Substrate und Produkte sind daher vermutlich in diesem Coimmobilisat geringer.

Das im Vorangehenden beschriebene Experiment zur Coimmobilisierung von Hefe und β -Galactosidase in Calciumalginat-Gel gewährleistet zwar durch kovalente Bindung des Enzyms an die Alginat-Matrix einen möglichst geringen Verlust an Biokatalysatoren, ist aber aufgrund seines Bedarfs an relativ teuren Chemikalien (Kupplungskomponenten und isoliertes Enzym) sowie seines großen zeitlichen Aufwandes kaum im Chemieunterricht zu realisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher noch eine stark vereinfachte experimentelle Variante entwickelt, die für die Durchführung in der Schule wesentlich besser geeignet ist. In Experiment 19 a) erfolgt ebenfalls zunächst die Herstellung eines Coimmobilisates von Hefe und β -Galactosidase in Calciumalginat, das dann im zweiten Teil des Versuchs auf seine Gärfähigkeit mit Molke als Substrat untersucht wird.

Anstelle hochreiner β -Galactosidase aus *Aspergillus orizae* kommt in der vereinfachten Versuchsalternative ein in der Apotheke relativ kostengünstig erhältliches Präparat („Enzym Lactase für eine gesunde Ernährung“, Firma Pro Natura) zum Einsatz. Dieses in Kapseln abgefüllte Enzym kann bei Raumtemperatur aufbewahrt und bei Bedarf jeweils portionsweise entnommen werden. Des Weiteren wurde die in Experiment 18 verwandte frische Backhefe aus praktischen Gründen (z. B. beschränkte Haltbarkeit, reduzierte Fermentationsaktivität mit zunehmendem Alter) durch Trockenhefe ersetzt.

Um den Chemikalien- und Zeitaufwand zu reduzieren, wird bei der Coimmobilisierung auf eine kovalente Bindung des Enzyms an die Alginat-Matrix verzichtet. Stattdessen arbeitet man nach einer vereinfachten Methode, bei der ein Teil der eingesetzten β -Galactosidase lediglich räumlich in der Gelmatrix eingeschlossen wird. Mit dieser Vorgehensweise sind zwar Enzym-Verluste verbunden, aber die hergestellten Coimmobilisate verfügen noch über genügend hohe Aktivitäten, um sie für die Lactose-Fermentation im schulischen Rahmen einsetzen zu können.

Das Coimmobilisat aus Experiment 19 a) wird dann in Versuchsteil b) einem Gärtest mit Molke unterzogen. Damit sich der Versuch ohne Probleme als Schülerübung durchführen

lässt, wurde hier besonders auf eine Minimierung des apparativen Aufwandes geachtet (zum Versuchsaufbau vgl. Experimenteller Teil).

Mit dem Experiment kann qualitativ nachgewiesen werden, dass die Immobilisate, in welchen Trockenhefe und β -Galactosidase und kombiniert vorliegen, die in Molke enthaltene Lactose unter Bildung von Ethanol und CO_2 umzusetzen vermögen. Mit einer Vergleichsprobe eines Hefe-Immobilisats ohne Enzym-Zusatz erfolgt hingegen keine Fermentation.

2.6.3.5 Schaumwein-Herstellung mit Calciumalginat-Hefe-Immobilisaten

Theoretischer Hintergrund

Da in Calciumalginat immobilisierte Hefe-Zellen über durchweg positive funktionelle Eigenschaften verfügen und vor allem toxikologisch völlig unbedenklich sind, kommen sie auch für den Einsatz in lebensmitteltechnologischen Gärungsprozessen in Betracht. So gibt es inzwischen Bestrebungen, diese Immobilisate für die Herstellung flaschenvergorener Schaumweine zu nutzen (Gòdia/Casas/Solà 1991, S. 468 ff.; Renn 1990, S. 8; Kunkel/Eschnauer 2002; Skjåk-Bræk/Martinsen 1991, S. 245).

Unterzieht man Wein nach Zusatz von Saccharose und Reinzuchthefer einer zweiten alkoholischen Gärung, so wird das Disaccharid von den Hefe-Zellen zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid umgesetzt. Auf diese Weise entsteht ein Getränk mit erhöhtem Alkoholgehalt, das über den für Schaumweine typischen CO_2 -Überdruck verfügt (Falbe/Regitz 1995 e, S. 4017). Abbildung 43 verdeutlicht den zuvor geschilderten Fermentationsprozess schematisch:

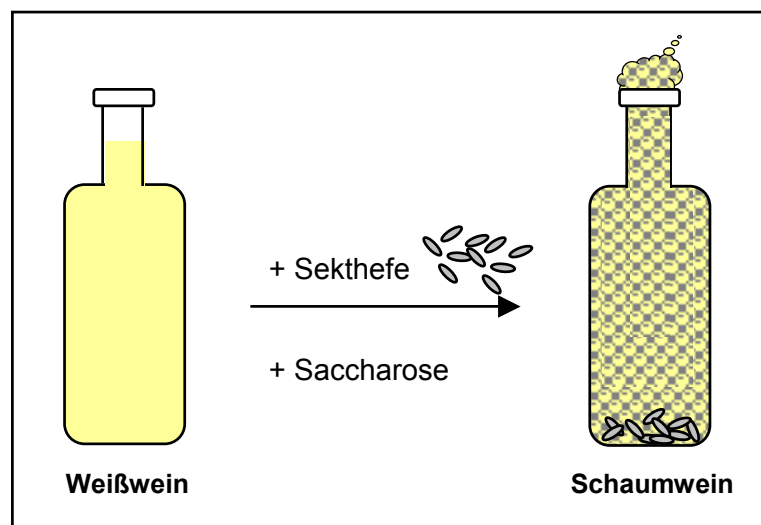
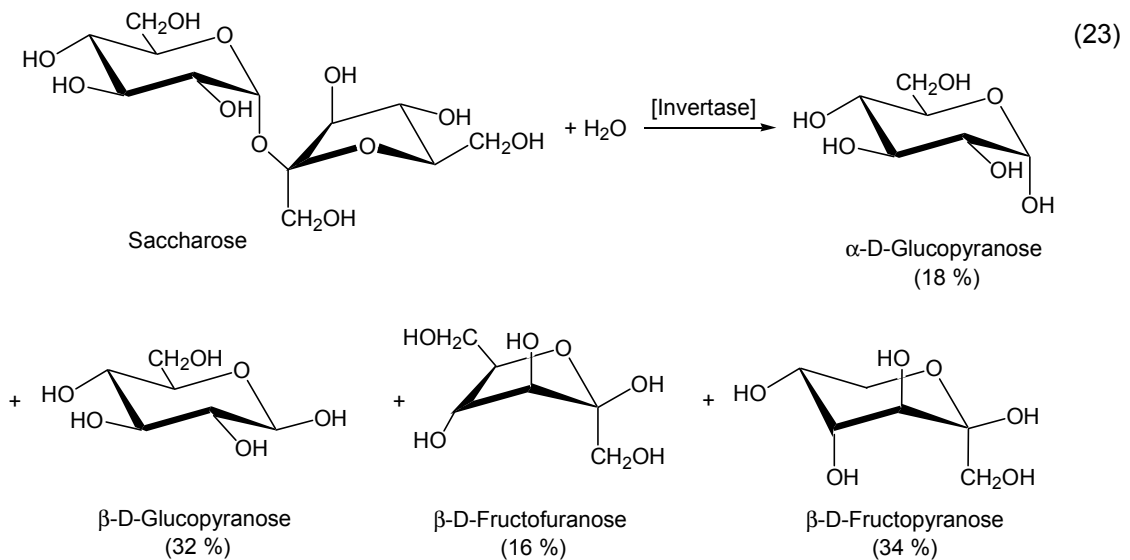


Abb. 43: Prinzip der Schaumwein-Herstellung nach dem Flaschengärverfahren.

Die Vorgänge, die mit der Vergärung von Saccharose durch Hefe im Zusammenhang stehen, seien im Folgenden kurz erläutert (vgl. Gleichung (23)):

Unter dem katalytischen Einfluss des in den Hefe-Zellen vorliegenden Enzyms Invertase wird das Disaccharid zunächst hydrolytisch in seine Monosaccharid-Bausteine α -D-Glucopyranose und β -D-Fructofuranose gespalten. In den sich anschließenden Mutatrotations-Prozessen stellen sich Gleichgewichte zwischen der α -D-Glucose und ihrem β -Anomeren bzw. der β -D-Fructofuranose und ihrer etwas stabileren Pyranoseform ein (Vollhardt 1990, S. 1094).



Unter anaeroben Bedingungen wird die bei der Saccharose-Hydrolyse gebildete D-Glucose von den Hefe-Zellen weiter zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid umgesetzt (vgl. Gleichung (14)). Die Mikroorganismen sind zudem in der Lage, D-Fructose zu metabolisieren (Falbe/Regitz 1995 b, S. 245).

Für die Sekundärfermentation werden zwar heutzutage häufig druckfeste Großraumbehälter aus Stahl eingesetzt, aber die Herstellung vieler hochwertiger Schaumweine, wie z. B. des Champagners, erfolgt nach der traditionellen „Méthode Champenoise“ immer noch durch Flaschengärung. Bei diesem Verfahren werden die mit Korken verschlossenen Schaumweinflaschen nach Umsetzung des zugefügten Zuckers zunächst 1 – 3 Jahre gelagert. Während dieser Zeit sedimentieren die Hefe-Zellen und bilden ein streifenförmiges Präzipitat auf der Flaschenwandung. Zur Entthefung des Schaumweines platziert man die Flaschen dann halsabwärts in so genannten „Rüttelpultern“, in denen sie so lange jeden Tag leicht um ihre Achse gedreht werden, bis sich die Hefe-Zellen als zusammenhängende Schicht auf dem Korken abgesetzt haben. Nach Frostern des Flaschenhalses und Entfernung des Korkens wird der nunmehr gefrorene Hefe-Pfropfen durch den CO₂-Druck aus der Flasche getrieben und lässt sich entfernen. Diesen Vorgang bezeichnet man als

das „Degorgieren“ des Schaumweines (Falbe/Regitz 1995 a, S. 110; Falbe/Regitz 1995 e, S. 4017; Gòdia/Casas/Solà 1991, S. 468).

Wie aus den vorangehenden Darlegungen hervorgeht, stellt die Abtrennung der Hefe-Zellen aus flaschenvergorenen Schaumweinen einen äußerst zeit- und arbeitsaufwändigen und folglich auch kostspieligen Vorgang dar. Angesichts dessen werden verschiedene Verfahren erprobt, mit deren Hilfe sich dieser Prozess effizienter gestalten lässt.

Eine sehr vielversprechende Vorgehensweise besteht darin, die Sekundärfermentation des Weins mit immobilisierter Hefe durchzuführen. Damit sind folgende Vorteile verbunden (Firma Erbslöh a und b; Gòdia/Casas/Solà 1991, S. 468; Kunkee/Eschnauer 2002; Skjåk-Bræk/Martinsen 1991, S. 245):

- Durch den Einschluss der Hefe-Zellen in eine Matrix aus Calciumalginat-Gel bleibt der Schaumwein während der Vergärung und Lagerung frei von unerwünschten Trübungen.
- Die bei der traditionellen Flaschengärung erforderliche Klärung des Schaumweines durch Abrütteln der Hefe entfällt.
- Die eingesetzten Immobilisat-Partikel lassen sich viel unproblematischer und vollständiger aus den Schaumweinflaschen entfernen als freie Hefe-Zellen.

Alginat ist auch in Deutschland als Zutat für die Herstellung von Schaumweinen zugelassen. Von der Firma Erbslöh wird im Handel unter dem Namen „Immoferm“ bereits eine immobilisierte, trockenlagerungsfähige Sektheife angeboten, die sich für die Flaschengärung eignet (Firma Erbslöh a und b).

Experimentelle Veranschaulichung

Zur Verwendbarkeit von Calciumalginat-Hefe-Immobilisaten für die Schaumwein-Herstellung wurden zwei Versuche konzipiert:

In Experiment 20 arbeitet man mit einem Spezialimmobilisat, das nach der von Klein/Vorlop/Steinert (1986; zitiert in Vorlop/Klein/Steinert 1987, S. 339 f.) entwickelten Patentmethode hergestellt wird. Die Besonderheit dieses Immobilisates besteht darin, dass es über eine äußere zellfreie Schicht aus Calciumalginat-Gel verfügt. Dadurch wird verhindert, dass eingeschlossene *Saccharomyces cerevisiae* im Laufe der Flaschengärung durch Wachstums- und Vermehrungsprozesse aus der Gelmatrix in das umliegende Medium freigesetzt wird, womit eine unerwünschte Trübung des Schaumweines verbunden wäre (Gòdia/Casas/Solà 1991, S. 468).

In Versuchsteil a) werden zunächst herkömmliche Immobilisat-Kugeln durch Eintropfen eines mit frischer Backhefe vermischten guluronatreichen Natriumalginat-Sols ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) in Calciumchlorid-Lösung ($w = 0,01$) hergestellt.

Zur Umhüllung mit einer zellfreien Schicht entfernt man die Calciumalginat-Hefe-Kugeln nach erfolgter Aushärtung aus dem Geliervbad, befreit sie von anhaftenden Resten der

Calciumchlorid-Lösung und bringt sie daraufhin in ein mit mittlerer Geschwindigkeit gerührtes Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 15 \text{ g/L}$) ein, in dem sie 15 Minuten verbleiben.

Während dieser Zeit diffundieren Ca^{2+} -Ionen aus den Immobilisat-Partikeln in die diese umgebende Algenpolysaccharid-Lösung und induzieren die Bildung einer zellfreien Gelschicht um jede der Kugeln.

Durch Variation der Verweildauer im Sol lässt sich die Dicke dieser äußeren Calciumalginat-Schicht regulieren.

Zur Stabilisierung der zellfreien Umhüllung werden die Calciumalginat-Spezialimmobilisate nach Abspülen mit entionisiertem Wasser schließlich nochmals in Calciumchlorid-Lösung ($w = 0,01$) ausgehärtet.

Abbildung 44 zeigt die Binokularaufnahme einer Kugel des Spezialimmobilisates in etwa dreißigfacher Vergrößerung: Das gelblich erscheinende hefehaltige Zentrum hebt sich deutlich von der transparenten Hüllschicht ohne Zellen ab.

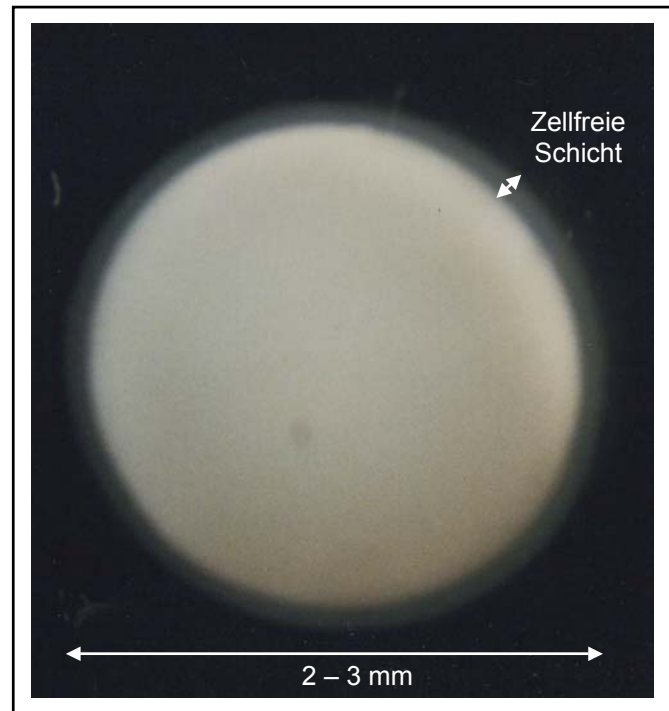


Abb. 44: Mit einer zellfreien Gelschicht umhüllte Calciumalginat-Hefe-Kugel in ca. dreißigfacher Vergrößerung (Experiment 20).

Im zweiten Teil von Experiment 20 wird dann die Verwendbarkeit der hergestellten Calciumalginat-Hefe-Kugeln für die Produktion flaschenvergorener Schaumweine demonstriert. Da es sich bei der Sekundärfermentation um einen etwa 3 – 4 Wochen dauernden Prozess handelt (Gòdia/Casas/Solà 1991, S. 469), musste ein Modellversuch entwickelt werden, mit dem sich die Gärfähigkeit des Immobilisates mit zellfreier Hüllschicht in deutlich kürzerer Zeit nachweisen lässt.

In Experiment 20 b) wird dieses Problem dadurch gelöst, dass man die Calciumalginat-Hefe-Kugeln bei $\vartheta_{\text{konst.}} = 37 \text{ °C}$ in Weißwein mit einem Saccharose-Gehalt von 24 g/L zur Reaktion bringt, obwohl die Sekundärfermentation technisch bei Raumtemperatur erfolgt. Das Kohlenstoffdioxid, welches bei der Umsetzung des Disaccharids durch die immobilisierten Hefe-Zellen entsteht, wird in ein Saugrohr mit Calciumhydroxid-Lösung eingeleitet. Um das Austreiben des Gases zu beschleunigen, rührt man den immobilisathaltigen Gäransatz mittels Magnetrührer und Rührfisch (zur Versuchsanordnung vgl. Experimenteller Teil, Kapitel 2.1.4.2).

Spätestens nach einer Reaktionszeit von 40 – 45 Minuten hat sich in dem Saugrohr mit Kalkwasser ein deutlicher weißer Niederschlag von Calciumcarbonat gebildet.

Experiment 20 eignet sich zwar sehr gut dazu, die Methode zur Herstellung von Spezialimmobilisaten für die Schaumwein-Produktion nachzuvollziehen, aber es ist im Hinblick auf den hohen Zeit- und Gerätebedarf nur sehr eingeschränkt in der Schule realisierbar. Daher wurde im Rahmen der Arbeit noch eine stark vereinfachte Versuchsvariante zu diesem Themenkomplex entwickelt:

Experiment 21 veranschaulicht auf didaktisch stärker reduzierte Weise die Einsetzbarkeit von Calciumalginat-Hefe-Immobilisaten für die Herstellung flaschenvergorener Schaumweine. In Versuchsteil a) immobilisiert man zunächst Trockenhefe in Calciumalginat-Gel. Auf eine Umhüllung der Immobilisat-Kugeln mit einer zellfreien Schicht wird dabei aus Zeitgründen verzichtet. Die erhaltenen Immobilisat-Partikel werden dann in Experiment 21 b) bei einer Temperatur von ca. 37 °C in verdünnter Weißwein-Lösung mit einer Saccharose-Konzentration von $\rho^* = 24 \text{ g/L}$ zur Reaktion gebracht. Dabei wurde die Versuchsanordnung so vereinfacht, dass auf den Einsatz von Magnetrührer und Kontaktthermometer verzichtet werden kann (vgl. Experimenteller Teil, Kapitel 2.1.4.2).

Bei der eigentlichen Schaumwein-Herstellung erfolgt die Saccharose-Fermentation mit einem Grundwein, dessen Ethanol-Gehalt 80 g/L beträgt. Durch die Verdünnung des Weißweins und die im Zusammenhang mit Experiment 20 angesprochene Temperaturerhöhung kann man aber den Gärvorgang in diesem Modellversuch so beschleunigen, dass das Kohlenstoffdioxid, welches bei der Umsetzung des Disaccharids durch die immobilisierten Hefe-Zellen entsteht, schon nach etwa 15 Minuten durch Einleitung in Kalkwasser nachgewiesen werden kann. Wie das Abfiltrieren der Calciumalginat-Hefe-Immobilisate am Ende von Experiment 21 b) deutlich macht, ist der hergestellte „Schaumwein“ frei von Hefe-Trübungen.

2.6.3.6 Immobilisierung von β -Galactosidase in Calciumalginat und Einsatz für die enzymatische Lactose-Spaltung

Biotechnologische Bedeutung von β -Galactosidase

Das Enzym β -Galactosidase (EC 3.2.1.23; frühere Bezeichnung: Lactase) katalysiert die hydrolytische Spaltung von Lactose (4-O- β -D-Galactopyranosyl-D-Glucose) in D-Galactose und D-Glucose (Falbe/Regitz 1995 b, S. 1470; Falbe/Regitz 1995 c, S. 2430; IUBMB 1992; Lorenzen 2000, S. 56). Der Mechanismus dieser Reaktion wird in Abbildung 45 schematisch dargestellt.

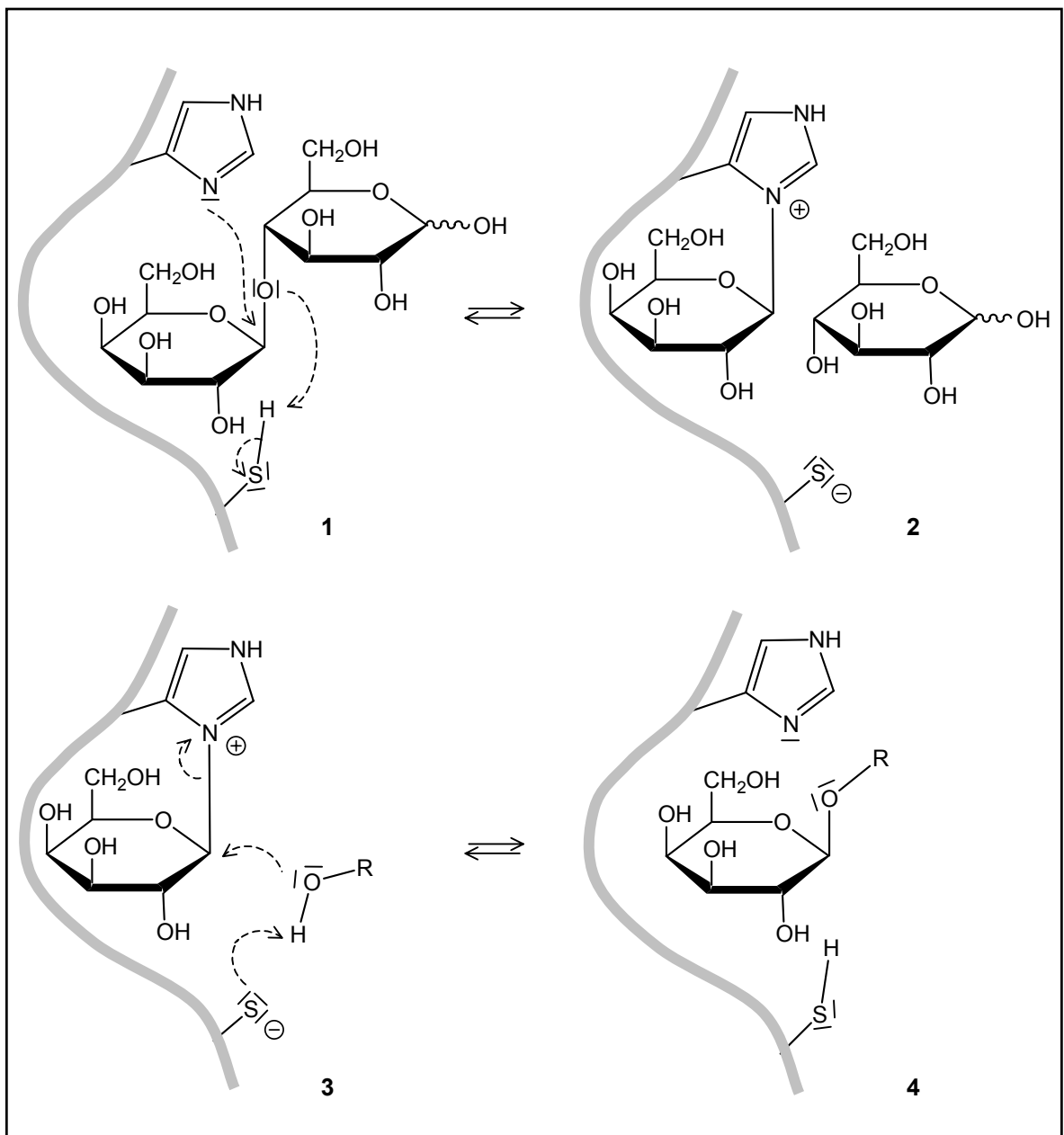


Abb. 45: Mechanismus der enzymatischen Lactose-Hydrolyse durch β -Galactosidase (Lorenzen 2000, S. 58).

Es bildet sich zunächst ein Enzym-Galactosyl-Komplex (1), aus dem im nächsten Reaktionsschritt Glucose freigesetzt wird (2). Daraufhin findet die Übertragung des Galactosyl-Restes auf einen nucleophilen Akzeptor mit einer Hydroxyl-Gruppe statt (3, 4). Wenn es sich bei dem Akzeptor um Wasser handelt, entsteht als Reaktionsprodukt Galactose. Da aber auch Lactose und die bei deren Hydrolyse entstehenden Monosaccharid-Bausteine über OH-Gruppen verfügen, können diese ebenfalls als Akzeptoren für den Galactosyl-Rest fungieren. Dies hat die Bildung von Oligosacchariden zur Folge. Das Enzym β -Galactosidase verfügt also nicht nur über Hydrolase- sondern auch über Transferase-Eigenschaften (Lorenzen 2000, S. 58)

Die enzymatische Lactose-Hydrolyse durch β -Galactosidase hat vor allem in zwei lebensmitteltechnologischen Bereichen Bedeutung erlangt: zum einen für die *Herstellung lactosearmer Milchprodukte* und zum anderen für die *Verwertung von Käsemolke*.

(1) *Herstellung lactosearmer Milchprodukte*

Lactose ist mit einem Gehalt von 4,6 – 5 % die bedeutsamste Kohlenhydrat-Komponente der Kuhmilch. Das Disaccharid wird daher auch als Milchzucker bezeichnet (Falbe/Regitz 1995 c, S. 2430; Falbe/Regitz 1995 d, S. 2789).

Lactose selbst wird vom menschlichen Organismus nicht absorbiert, sondern muss zuvor im Dünndarm unter katalytischem Einfluss von β -Galactosidase in D-Glucose und D-Galactose gespalten werden. Im Säuglings- und Kleinkindalter wird das Enzym normalerweise in ausreichendem Maße gebildet, aber bei Erwachsenen geht die β -Galactosidase-Aktivität häufig zurück oder ist überhaupt nicht mehr vorhanden (Falbe/Regitz 1995 c, S. 2430, Lahbahn-Lucius 1991, S. 32). Während bei an den lebenslangen Konsum von Milchprodukten gewöhnten Europäern (z. B. Schweden, Engländern, Deutschen und Schweizern) im Durchschnitt nur weniger als 10 % der Bevölkerung Probleme mit der Lactose-Verwertung haben, treten insbesondere bei Asiaten, Afrikanern, Indianern und Aborigines im Falle der Aufnahme von Milchzucker erhebliche Verdauungsstörungen, wie z. B. Krämpfe und Durchfall, auf (Falbe/Regitz 1995 c, S. 2430; Ruttloff/Proll/Leuchtenberger 1997, S. 60).

Diese als Lactose-Malabsorption bzw. -Intoleranz bezeichnete Unverträglichkeit hat folgende Ursachen (Falbe/Regitz 1995 c, S. 2430; Lahbahn-Lucius 1991, 32; Lorenzen 2000, S. 56; Ruttloff/Proll/Leuchtenberger 1997, S. 59 f., 257 f.): Wenn Patienten mit unzureichender β -Galactosidase-Aktivität lactosehaltige Produkte zu sich nehmen, kann das Disaccharid nicht mehr im Dünndarm gespalten und resorbiert werden, sondern gelangt in den Dickdarm. Aufgrund der Präsenz von großen Lactose-Mengen kommt es dort zu einer Erhöhung der Osmolarität. Dies hat eine vermehrte Wasser-Abgabe in den Stuhl und damit das Auftreten von Diarrhöen zur Folge.

Der Milchzucker-Abbau erfolgt dann durch im Dickdarm angesiedelte Bakterien, wobei sich kurzkettige organische Fettsäuren und verstärkt auch Gärungsgase bilden, die für das Auftreten von Blähungen und Krämpfen verantwortlich sind.

Langfristig können die mit der Lactose-Malabsorption verbundenen Verdauungsstörungen sogar zu Schädigungen der Darmschleimhaut führen.

Abhilfe für betroffene Personen kann durch eine milchzuckerfreie Diät oder den Verzehr von Milchprodukten geschaffen werden, in denen die Lactose bereits industriell unter Einsatz von β -Galactosidase in D-Glucose und D-Galactose gespalten wurde. Ein weiterer Ausweg für lactoseintolerante Patienten besteht darin, zusammen mit milchzuckerhaltigen Speisen direkt Enzym-Präparate einzunehmen, die inzwischen in vielen Reformhäusern und Apotheken erhältlich sind. Diese Vorgehensweise birgt jedoch unter Umständen gesundheitlichen Gefahren, wie z. B. die Möglichkeit des Auftretens von Allergien (Bódalo 1991, S. 349).

Die enzymatische Spaltung der in Milch vorhandenen Lactose kann aber nicht nur aus ernährungsphysiologischer, sondern auch aus lebensmitteltechnologischer Sicht von Vorteil sein:

Wie aus Tabelle 15 ersichtlich ist, verfügen die Hydrolyse-Produkte D-Glucose und D-Galactose nämlich über eine wesentlich bessere Wasserlöslichkeit und höhere Süßkraft als das Disaccharid selbst.

Durch vorhergehende Spaltung des Milchzuckers unter Einsatz von β -

Galactosidase lassen sich die sensorischen Eigenschaften von Lebensmitteln, die durch das Auskristallisieren von Lactose typischerweise einen „sandigen“ Geschmack bekommen, entscheidend verbessern. Zu diesen Produkten gehören z. B. kühl gelagerte oder aufkonzentrierte Produkte wie Speiseeis, Süßwaren und Kondensmilch. Zudem wirkt sich die mit der Lactose-Hydrolyse verbundene Steigerung der Süße dahingehend positiv aus, dass den betreffenden Erzeugnissen nur noch in geringerem Umfang andere Zucker zugefügt werden müssen (Eisenbrand/Schreier 1995, S. 479; Gekas/López-Leiva 1985, S. 2; Lorenzen 2000, S. 56). Auf diese Weise ist in Milchprodukten die Einsparung von etwa 20 – 40 % Saccharose möglich (Reimerdes 1984, S. 32).

Tab. 15: Vergleich der Löslichkeiten und Süße von Lactose und ihren Spaltprodukten (Lorenzen (2000, S. 56).

Zucker	Löslichkeit bei $\vartheta = 30\text{ °C}$	Relative Süße (rS) ^a
Lactose	20 g/L	0,22
D-Glucose	54 g/L	0,42
D-Galactose	36 g/L	0,45

^a Bezugssubstanz: Saccharose (rS = 1)

(2) Verwertung von Käsemolke

Der zweite industrielle Bereich, in dem die enzymatische Lactose-Spaltung eine bedeutende Rolle spielt, besteht in der Verwertung der bei der Käseherstellung anfallenden Molkeabfälle. Volumenmäßig belaufen sich diese auf etwa 80 % der eingesetzten Milch und verursachen erhebliche Entsorgungskosten (Reimerdes 1984, S. 27). Wie bereits in Kapitel 2.6.3.4 des Theoretischen Teils angedeutet wurde, besteht eine Möglichkeit der Verarbeitung dieser Abfälle in der Herstellung von Molkekonzentraten und -pulvern für die Futtermittelindustrie. Ein wirtschaftlich deutlich sinnvollerer Einsatzzweck für Molke kann aber dadurch geschaffen werden, dass man nach Deproteinierung und Entsalzung die enthaltene Lactose enzymatisch hydrolysiert. Das dabei entstehende Produkt verfügt über eine hohe Süßkraft und gute Konservierungseigenschaften und lässt sich in der Lebensmittelindustrie auf ähnliche Weise verwenden wie der durch Stärke-Abbau erzeugbare Glucose-Sirup (Lieske/Konrad 1988, S. 585; Reimerdes 1984, S. 32; Sprössler/Plainer 1983, S. 93; Wenck/März 1988, S. 37). Nach enzymatischer Milchzucker-Spaltung ist es außerdem möglich, Molke als Substrat für die fermentative Ethanol-Gewinnung zu nutzen (vgl. Kapitel 2.6.3.4).

Gewinnung, Immobilisierung und industrielle Anwendung von β -Galactosidase

β -Galactosidase-Präparate für die Lactose-Hydrolyse werden fermentationstechnisch aus Mikroorganismen gewonnen (Rutloff/Proll/Leuchtenberger 1997, S. 257). Dazu zählen vor allem die in Tabelle 16 aufgeführten Schimmelpilze und Hefen, die sich unter anderem durch die Lage ihrer pH-Optima unterscheiden:

Tab. 16: Mikroorganismen, aus denen β -Galactosidase für lebensmitteltechnologische Einsatzzwecke isoliert wird (Gekas/López-Leiva 1985, S. 4; Park/Pastore 1988, S. 229; Sprössler/Plainer 1983, S. 93).

Mikroorganismen	pH-Optima
<u>Schimmelpilze</u>	
<i>Aspergillus niger</i>	3,5 – 4,5
<i>Aspergillus oryzae</i>	4,0 – 5,0
<u>Hefen</u>	
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,3 – 6,5
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9 – 7,2
<i>Saccharomyces lactis</i>	7,0

Auch Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli*, produzieren β -Galactosidasen. Diese Enzyme sind zwar sehr gut untersucht, dürfen aber aufgrund ihres potentiellen Gehaltes an toxischen Verunreinigungen nicht für die Lebensmittelverarbeitung verwandt werden.

Da die Isolierung von β -Galactosidase aus Schimmelpilzen und Hefen relativ aufwändig und somit kostspielig ist, versucht man, die technische Lactose-Hydrolyse möglichst mit immobilisierten Biokatalysatoren durchzuführen (Lahbahn-Lucius 1991, S. 33; Rutloff/Proll/Leuchtenberger 1997, S. 257 f.; Wenck/März 1988, S. 37). Mit der Immobilisierung von Enzymen sind vor allem die in Tabelle 17 angegebenen Vor- und Nachteile verbunden:

Tab. 17: Faktoren, die für bzw. gegen die Enzym-Immobilisierung sprechen (Sprössler/Plainer 1983, S. 93; verändert).

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> • Kosteneinsparung durch Mehrfachverwendung • Eignung für kontinuierliche Prozessführung • Keine Enzym-Kontamination im Produkt • Konstante Produkt-Qualität 	<ul style="list-style-type: none"> • Kosten für Trägermaterial und Fixierung • Aktivitätsverlust bei der Immobilisierung • Technisch aufwändigere Verfahren • Risiko mikrobieller Kontamination

Für die Immobilisierung von β -Galactosidase wurde eine Vielzahl synthetischer und natürlicher Trägermaterialien getestet. Die Diskussion aller zugrundeliegenden Untersuchungen geht aber über den Rahmen dieser Arbeit hinaus. Für einen Überblick sei daher auf Gekas/López-Leiva (1985, S. 7 f.) und Richmond/Gray/Stine (1981, S. 1764 ff.) verwiesen. Eine Vorgehensweise, die sich industriell bewährt hat, besteht im Einschluss von β -Galactosidase in Cellulosetriacetat-Fasern (Lorenzen 2000, S. 56; Rutloff/Proll/Leuchtenberger 1997, S. 257 f.): In Italien wird z. B. von der Firma Snamprogetti lactosereduzierte Milch in Reaktoren mit semipermeablen Membranen hergestellt, die aus Bündeln dieser Immobilisat-Fasern bestehen. Die Membranporen verfügen über Größen, die zwar den Durchtritt von Lactose und ihren enzymatischen Spaltprodukten gestatten, aber größere Teilchen (z. B. Milchproteine) zurückhalten. Wie Abbildung 46 schematisch veranschaulicht, gelangt die Lactose, die in der durch den Reaktor geleiteten Milch vorliegt, in das Lumen des membranbegrenzten Raumes und wird dort unter dem katalytischen Einfluss von β -Galactosidase in D-Glucose und D-Galactose zerlegt. Die Hydrolyse-Produkte werden anschließend wieder der Milch wieder zugeführt.

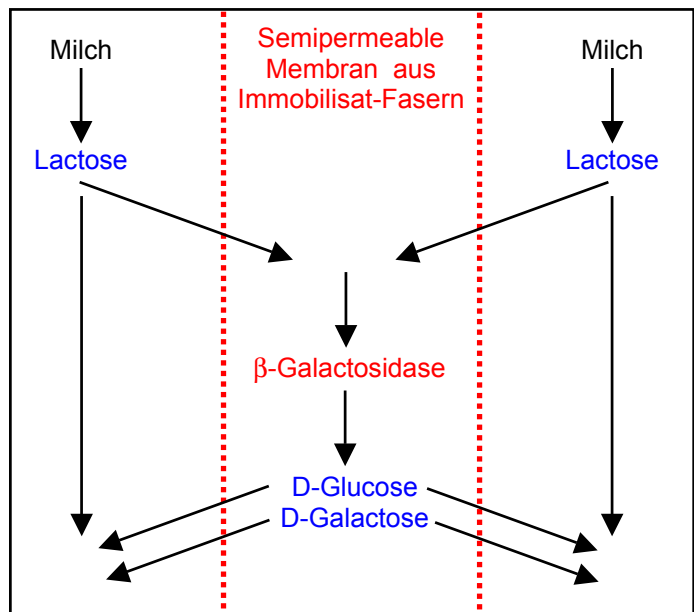


Abb. 46: Lactose-Hydrolyse in Milch mit in Cellulosetriacetat-Fasern immobilisierter β -Galactosidase (Rutloff/Proll/Leuchtenberger 1997, S. 258.)

Auch Calciumalginat wurde bereits als Träger für die Immobilisierung von β -Galactosidase in Betracht gezogen. Wie bereits in Kapitel 2.6.3.4 diskutiert, ist jedoch der Matrixeinschluss von Enzymen in diesem Material mit Problemen verbunden, weil die Größe der Poren im Algenpolysaccharid-Gel eine quantitative Rückhaltung von Protein-Molekülen erschwert. Vergleichende Untersuchungen zur β -Galactosidase-Immobilisierung mit unterschiedlichen Trägern haben allerdings gezeigt, dass durch hohe Alginat-Konzentrationen ($\rho^* = 30 \text{ g/L}$) die Freisetzung des Enzyms aus der Algenpolysaccharid-Matrix vollständig verhindert werden kann (Bódalo et al. 1991, S. 353). Trotzdem erwiesen sich die auf diese Weise hergestellten Calciumalginat- β -Galactosidase-Immobilisate als wenig geeignet für die Lactose-Hydrolyse, da ihre spezifische Aktivität im Vergleich zur äquivalenten Menge löslichen Enzyms nur 6,29 % betrug (Bódalo et al. (1991, S. 352).

Bódalo et al. (1991, S. 353) führen dies darauf zurück, dass nur ein geringer Anteil des immobilisierten Proteins in der Gelmatrix aktiv bleibt. Ein Grund dafür könnte z. B. eine durch die Immobilisierung bedingte Änderung der Enzym-Konformation sein. Des Weiteren ist denkbar, dass in der Mikroumgebung der in Calciumalginat eingeschlossenen β -Galactosidase ungünstige Bedingungen für die Lactose-Hydrolyse vorherrschen, die zu niedrigen Enzym-Aktivitäten führen.

Versuche zur Immobilisierung von β -Galactosidase in Calciumalginat-Gel unter kovalenter Bindung des Enzyms an die Algenpolysaccharid-Matrix

Die Einsetzbarkeit von in Calciumalginat-Kugeln immobilisierter β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*) soll anhand eines Modellexperimentes näher untersucht werden:

Im ersten Teil des Versuches (Experiment 22 a)) koppelt man das Enzym zunächst nach der schon in Kapitel 2.6.3.4 diskutierten Methode von Hahn-Hägerdal (1984, S. 771 ff.) kovalent über Peptid-Bindungen an das Algenpolysaccharid und schließt es daraufhin in einer Matrix aus hochkonzentriertem, guluronatreichen Calciumalginat-Gel ein.

In Experiment 22 b) wird das hergestellte Immobilisat dann auf seine Tauglichkeit für die Lactose-Spaltung in H-Milch überprüft. Dazu bringt man 30 g der β -galactosidasehaltigen Calciumalginat-Kugeln zusammen mit 30 mL H-Milch in eine mit einem Glaswolle-Pfropfen versehene und mittels Schlauch und Quetschhahn verschlossene Ionenaustauschersäule ein (zum Versuchsaufbau vgl. Abbildung 47).

Nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten wird die enzymatisch umgesetzte H-Milch in einen Weithalserlenmeyerkolben (50 mL) abgelassen. Mit Hilfe von Glucose-Teststäbchen überprüft man, ob unter dem Einfluss der immobilisierten β -Galactosidase eine hydrolytische Spaltung der Lactose stattgefunden hat. Man beobachtet innerhalb des zulässigen zeitlichen Rahmens eine grüne Verfärbung des Testfeldes, durch welche Glucose spezifisch nachgewiesen wird.

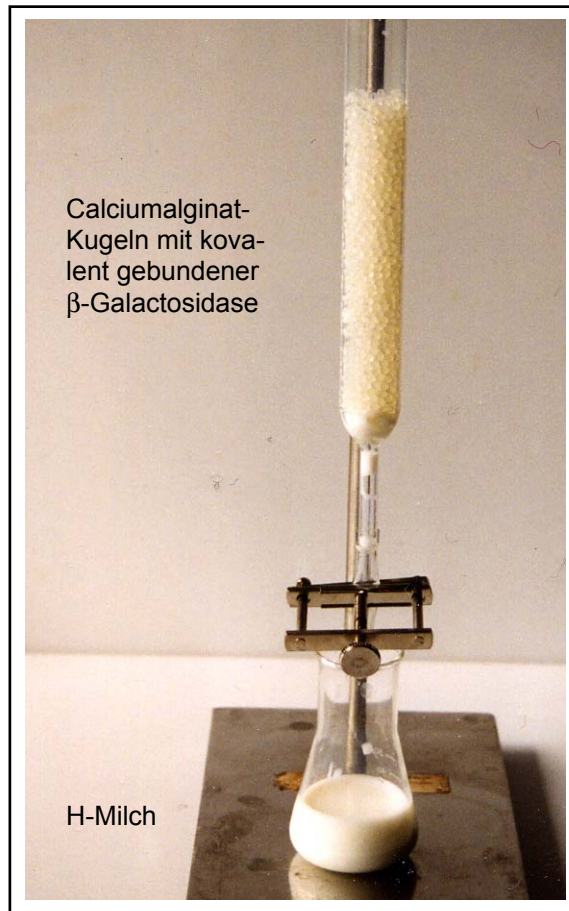
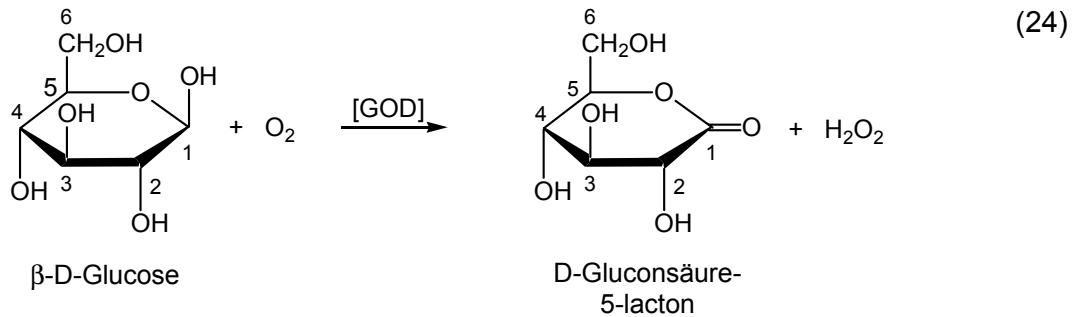


Abb. 47: Enzymatische Spaltung der in H-Milch enthaltenen Lactose mit in Calciumalginat-Gel immobilisierter β -Galactosidase (Experiment 22 b)).

Der spezifische Nachweis von Glucose mit Teststäbchen soll im Folgenden näher betrachtet werden (Bergmeyer 1974, S. 1250 f.; Labahn-Lucius 1989, S. 496):

Handelsübliche Glucose-Teststreifen enthalten die Enzyme Glucoseoxidase (GOD) und Peroxidase (POD) sowie einen als Redoxindikator fungierenden Stoff. Bei letzterem handelt es sich häufig um 3,3',5,5'-Tetramethyl-biphenyl-4,4'-diamin (TMB) (Falbe/Regitz 1995 f, S. 4532). Die mit dem enzymatischen Nachweis von Glucose verbundenen Reaktionen werden in den Gleichungen (24) und (25) schematisch dargestellt:

Im ersten Reaktionsschritt wird Glucose unter dem katalytischen Einfluss des Enzyms Glucoseoxidase (GOD) durch Luftsauerstoff zu D-Gluconsäure-5-lacton oxidiert. Als weiteres Produkt entsteht dabei Wasserstoffperoxid.



Im wässrigen Milieu hydrolysiert D-Gluconsäure-5-lacton allmählich zu D-Gluconsäure (vgl. Gleichung (16), Kapitel 2.6.3.3).

Der in den Teststreifen vorliegende Redoxindikator (allgemeine Form: DH_2) wird durch das bei der Oxidation von Glucose nach Gleichung (24) erzeugte Wasserstoffperoxid in Gegenwart des Enzyms Peroxidase (POD) in seine oxidierte farbige Form (D) überführt.



Liegt in den Teststäbchen 3,3',5,5'-Tetramethyl-biphenyl-4,4'-diamin (TMB) als Redoxindikator vor, so wird die Anwesenheit von Glucose durch eine grüne Verfärbung des Testfeldes angezeigt.

Versuche zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität freier und kovalent gebundener β -Galactosidase

In Experiment 22 b) wurden Immobilisate mit kovalent an Alginat gebundener und in Calciumalginat-Kugeln eingeschlossener β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*) qualitativ auf ihre Hydrolyse-Fähigkeit der in Milch enthaltenen Lactose überprüft.

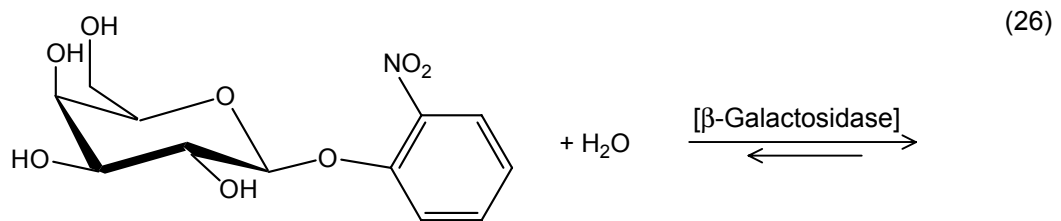
In einem Folgeversuch soll nun die enzymatische Aktivität derartiger Immobilisate quantitativ bestimmt und mit der Hydrolyse-Leistung von freier β -Galactosidase verglichen werden.

In Experiment 23 a) erfolgt zunächst die kovalente Bindung des Enzyms an guluronat- bzw. mannuronatreiches Alginat. Dabei wird wiederum nach der Methode von Hahn-Hägerdal (1984, S. 771 ff.) gearbeitet. Die beiden Kupplungsansätze werden dann jeweils mit einer konzentrierten Lösung von Natriumalginat mit hohem GG-Anteil gemischt und mit Hilfe einer Spritze in Calciumchlorid-Lösung eingetroppt.

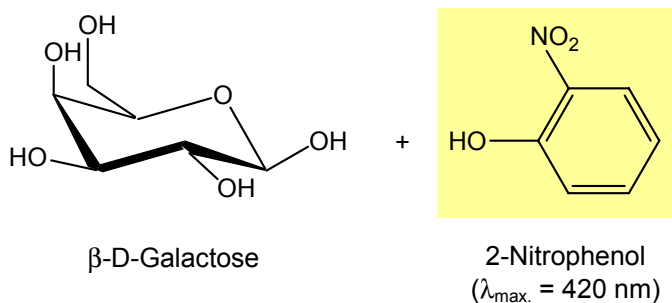
Im zweiten und dritten Teil des Versuches ermittelt man dann die enzymatischen Aktivitäten der hergestellten Immobilisate in einer Kurzzeit- und einer Langzeitmessung (Experimente 23 b) bzw. c)) und setzt sie ins Verhältnis zu der Hydrolyse-Leistung löslicher β -Galactosidase.

Die Bestimmungen erfolgen nach der in Hartmeier (1986, S. 162) beschriebenen photometrischen Methode unter Verwendung von 2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) als Substrat. Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, dass β -Galactosidase nicht nur Lactose enzymatisch umsetzen kann, sondern auch in der Lage ist, andere β -galactosidische Substrate von der Galactose-Seite her aufzuspalten (Eisenbrand/Schreier, 1995, S. 479). In diesen Fällen wird anstelle von Glucose ein anderer Rest freigesetzt (vgl. dazu auch Mechanismus in Abbildung 45).

Die hydrolytische Spaltung von 2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid unter dem katalytischen Einfluss von β -Galactosidase wird in Gleichung (26) schematisch zusammengefasst:



2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG)



Als Reaktionsprodukte entstehen primär β -D-Galactose und 2-Nitrophenol. Das Monosaccharid unterliegt aber in wässriger Lösung der Mutarotation, so dass nach Einstellung des Gleichgewichtes sowohl α - als auch β -D-Galactose in der Reaktionsmischung vorhanden sind.

Die quantitative Bestimmung des bei der enzymatischen Hydrolyse gebildeten gelben 2-Nitrophenols erfolgt durch Extinktions-Messung mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 420 \text{ nm}$. Für die Details der Durchführung und Auswertung der photometrischen Untersuchungen sei auf den Experimentellen Teil verwiesen (vgl. Kapitel 2.1.4.2, Versuche 23 a) und b)). An dieser Stelle sollen lediglich die Ergebnisse diskutiert werden: In einer Kurzzeitmessung (Experiment 23 b)) erfolgte zunächst die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von β -Galactosidase während einer Reaktionszeit von 30 min bei $\vartheta = 37 \text{ }^\circ\text{C}$. Nach Aufnahme von drei Kalibriergeraden mit einer Verdünnungsreihe unterschiedlich konzentrierter Enzym-Lösungen wurden auch die beiden Immobilisate unter-

sucht, in denen β -Galactosidase kovalent an guluronat- bzw. mannuronatreiches Alginat gebunden vorlag. Bezogen auf die Hydrolyse-Leistung des nicht immobilisierten Enzyms konnten für die Immobilisate die in Tabelle 18 angegebenen relativen β -Galactosidase-Aktivitäten festgestellt werden:

Tab. 18: Photometrisch bestimmte relative Hydrolyse-Aktivitäten zweier verschiedener Immobilisate von β -Galactosidase in Calciumalginat-Gel (Experiment 23 b), Kurzzeitmessung: 30 min bei 37 °C, Substrat: ONPG)

Kenndaten des Immobilisates	Immobilisat 1: Kovalente Bindung an GG-reiches Natriumalginat			Immobilisat 2: Kovalente Bindung an MM-reiches Natriumalginat		
	3	4	8	3	4	8
Alter in d	3	4	8	3	4	8
Masse der Immobilisat-Kugel in mg	17	17	17	17	17	17
Relative Aktivität im Vergleich zur äquivalenten Menge löslichen Enzyms	5,8 %	4,3 %	3,0 %	8,4 %	5,6 %	5,0 %

Wie ersichtlich ist, weisen beide Immobilisate im Vergleich zum löslichen Enzym nur sehr geringe Hydrolyseaktivitäten auf, die sich mit zunehmendem Alter noch weiter reduzieren. Außerdem ist auffällig, dass die kovalent an guluronatreiches Alginat gebundene β -Galactosidase niedrigere Spaltleistungen zeigt als das Enzym im Ansatz mit Kopplung an eine Algenpolysaccharid-Variante mit hohem Mannuronat-Gehalt.

Für die ermittelten Werte gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten:

Die niedrigen enzymatischen Aktivitäten der Immobilisate können auf β -Galactosidase-Verluste während der kovalenten Bindung und dem Matrixeinschluss des Biokatalysators zurückzuführen sein.

Die Enzym-Kopplung funktioniert möglicherweise besser mit mannuronatreichem Alginat, da hier aus sterischen Gründen die Carboxylat-Gruppe für die Bildung des Aktivesters und den sich anschließenden nucleophilen Angriff der freien Amino-Gruppe des Enzyms leichter zugänglich ist (vgl. Konformationen der Alginat-Blocktypen in Kapitel 2.2.1 des Theoretischen Teils sowie Gleichungen (20) und (21)).

Biokatalysator-Verluste von über 90 % sind allerdings bei der angewandten Vorgehensweise als eher unwahrscheinlich anzusehen, da die angewandte Kupplungs-Methode bewährt ist. Außerdem wurde für den Matrixeinschluss der kovalent an das Polysaccharid-Derivat gebundenen β -Galactosidase konzentrierte, guluronatreiche Alginat-Lösung verwendet, wodurch die Gelstärke im Immobilisat so hoch sein sollte, dass Enzym-Verluste durch Diffusion von Protein-Molekülen aus der Gelmatrix weitgehend auszuschließen sind (vgl. dazu auch Bódalo et al. 1991, S. 353).

Die extrem niedrigen relativen Hydrolyse-Aktivitäten der Immobilisate müssen folglich noch andere Ursachen haben. Dazu gehören z. B. Änderungen der Enzym-Konformation

oder Denaturierungsprozesse, die das Enzym unter Umständen bei der kovalenten Bindung an das Algenpolysaccharid bzw. bei der Immobilisierung in Calciumalginate-Gel erfährt. Dies wird auch in Untersuchungen von Bódalo et al. (1991, S. 353) als mögliche Erklärung für die niedrigen enzymatischen Aktivitäten von in Calciumalginate eingeschlossener β -Galactosidase angegeben. Dort wird außerdem diskutiert, dass Calciumalginate-Gel als Mikroumgebung für die Lactose-Spaltung durch β -Galactosidase ungünstige Bedingungen (z. B. pH-Wert, Ionenmilieu) aufweisen könnte.

Dazu gehören unter anderem auch die Diffusions-Limitationen für Substrat und Produkte der enzymatischen Reaktion, die ja insbesondere in den eingesetzten hochkonzentrierten Calciumalginate-Gelen sehr hoch sein sollten.

Um zu untersuchen, ob die sehr niedrigen enzymatischen Aktivitäten der in Experiment 23 a) hergestellten Immobilisate eventuell auch darauf zurückzuführen sind, dass bei der Kurzzeitmessung über einen Zeitraum von 30 Minuten die Diffusionsbarriere des Calciumalginate-Gels noch nicht genügend von Substrat und Produkten überwunden werden kann, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich eine photometrische Langzeitbestimmung durchgeführt (vgl. Experiment 23 c)). In diesem Versuch werden die Hydrolyse-Leistungen der Immobilisate aus Versuchsteil a) während 17 Stunden bei Raumtemperatur verfolgt.

Bei der Langzeituntersuchung wurden wiederum zunächst in drei Messreihen Kalibrierkurven mit Konzentrationreihen von β -Galactosidase-Lösungen erstellt, auf die sich dann die für die Immobilisate ermittelten Hydrolyse-Leistungen beziehen lassen. Im Vergleich zum nicht immobilisierten Enzym ergaben sich für die beiden Immobilisat-Ansätze mit Koppelung an guluronat- bzw. mannuronatreiches Alginate folgende relativen Aktivitäten:

Tab. 19: Photometrisch bestimmte relative Hydrolyse-Aktivitäten zweier verschiedener Immobilisate von β -Galactosidase in Calciumalginate-Gel (Experiment 23 c)), Langzeitmessung: 27 h bei Raumtemperatur, Substrat: ONPG)

Kenndaten des Immobilisates	Immobilisat 1: Kovalente Bindung an GG-reiches Natriumalginate			Immobilisat 2: Kovalente Bindung an MM-reiches Natriumalginate		
	Alter in d	1	1	1	1	1
Masse der Immobilisat-Kugel in mg	36 ^a	40 ^a	36 ^a	17	17	18
Relative Aktivität im Vergleich zur äquivalenten Menge löslichen Enzyms	8,9 %	9,4 %	8,8 %	10,5 %	8,3 %	10,5 %

^a Die eingesetzte Wund- und Blasenspritze verfügte über einen Adapter mit vom Normwert abweichendem Innendurchmesser.

Wie aus Tabelle 19 ersichtlich ist, liegen die ermittelten relativen Aktivitäten der β -Galactosidase-Immobilisate bei der Langzeitmessung deutlich höher. Anfängliche Diffusionsbar-

rieren könnten also mit dafür verantwortlich sein, dass bei den photometrischen Kurzzeituntersuchungen noch niedrigere relative Spaltleistungen beobachtet wurden.

Problematisch für einen direkten Vergleich der bei der Lang- und Kurzzeitstudie erhaltenen Werte sind allerdings die Unterschiede im Alter der untersuchten Immobilisate sowie die Tatsache, dass bei der Aktivitätsbestimmung über einen Zeitraum von 17 Stunden ein Ansatz mit guluronatreichem Alginat verwandt wurde, dessen Kugelgröße von der der anderen Immobilisate abwich.

Da die relativen Hydrolyse-Leistungen der Immobilisate aus Experiment 23 aber auch im Langzeitversuch noch so niedrig lagen, dass sie für einen potentiellen technischen Einsatz nicht in Erwägung zu ziehen sind, wurde auf weiterführende Versuche zu diesem Themenkomplex verzichtet.

Schulversuche zur vereinfachten Immobilisierung von β -Galactosidase in Calciumalginat-Gel und zur Anwendung des Immobilisates für die enzymatische Spaltung von Lactose in Milch und Molke

Obwohl Immobilisate von β -Galactosidase in Calciumalginat-Gel für den industriellen Einsatz viel zu niedrige Hydrolyse-Aktivitäten aufweisen, sind sie als Modellsysteme für den Einsatz in Chemieunterricht sehr gut geeignet, um Schülern die Grundprinzipien der Enzym-Immobilisierung sowie die mit diesem Verfahren verbundenen Vorzüge und Nachteile deutlich zu machen.

Am Beispiel der alltagsrelevanten Problematik der Spaltung von Lactose in Milch und Molke wurde daher in der vorliegenden Arbeit eine Versuchsreihe zum vereinfachten Matrixeinschluss von β -Galactosidase in Calciumalginat-Gel sowie zur Verwendbarkeit der hergestellten Immobilisate für die Lactose-Hydrolyse entwickelt.

Zu diesem Themenkomplex gibt es bereits einige biologische- und chemiedidaktische Veröffentlichungen (vgl. z. B. Labahn-Lucius 1990, S. 108 – 113 und 1991, S. 32 – 37; National Centre For Biotechnology Education 2003), die als Ausgangsbasis für die Konzeption der hier vorgestellten Versuche dienen.

Ein wichtiges Ziel bei der Modifizierung existierender Arbeitsvorschriften bestand darin, diese so zu optimieren, dass sie im Hinblick auf den erforderlichen Chemikalien-, Geräte- und Zeitaufwand möglichst gut in der Schule realisierbar sind. Des Weiteren sollten die publizierten Versuche um den Aspekt einer durch einfache Experimente untermauerten kritischen Auseinandersetzung mit den Möglichkeiten und Grenzen der Enzym-Immobilisierung mit Calciumalginat erweitert werden.

Als β -Galactosidase-Präparat verwendet man in Experiment 24 Enzym-Kapseln der Firma Pro Natura („Enzym Lactase für eine gesunde Ernährung“), die in der Apotheke für lactoseintolerante Patienten rezeptfrei angeboten werden. Dieses Nahrungsergänzungsmittel weist gegenüber im Chemikalienhandel verfügbaren hochreinen β -Galactosidase-Präpa-

raten dahingehend Vorteile auf, dass es wesentlich preisgünstiger ist und problemlos bei Raumtemperatur gelagert werden kann.

In Versuchsteil a) wird eine einfache Methode vorgestellt, mit der sich das in den Kapseln enthaltene Enzym mit minimalem Geräte- und Zeitaufwand ohne Einsatz eines Magnet-rührers in Calciumalginat-Gel einschließen lässt. Dabei wurde auf die kovalente Bindung der β -Galactosidase an die Alginat-Matrix verzichtet, da diese Vorgehensweise aus den bereits in Teil B, Kapitel 2.6.3.4 diskutierten Gründen in der Schule nicht realisierbar ist.

Die in Experiment 24 a) hergestellten Immobilisat-Kugeln werden in einem Folgeversuch auf ihre Fähigkeit überprüft, die in H-Milch bzw. Molke enthaltene Lactose zu hydrolysieren. Wie aus Abbildung 48 ersichtlich ist, kommt dabei als Modellreaktor eine mit Schlauchstück und Quetschhahn versehene 20-mL-Spritze zum Einsatz (verändert nach National Centre of Biotechnology Education 2003).

Als geeignet für den Verschluss von Spritzenauslässen haben sich im Rahmen der Arbeit die in Apotheken relativ günstig erhältlichen Schläuche von Schwerkraft-Infusionsgeräten (z. B. „Infrafix® Air“, Firma Braun) bewährt.

Für die enzymatische Disaccharid-Spaltung füllt man die Apparatur mit den in Versuchsteil a) hergestellten Immobilisat-Kugeln sowie 10 mL Substrat-Lösung. Falls weder H-Milch noch Molke vorhanden sind, kann der Versuch auch mit Lactose-Lösung durchgeführt werden, deren Disaccharid-Gehalt ungefähr dem von Vollmilch entspricht. Nach Reaktionszeiten von 5, 10 und 15 Minuten wird dann jeweils die gesamte Reaktionslösung in den Erlenmeyerkolben abgelassen, mit Teststäbchen auf ihren Glucose-Gehalt untersucht und danach zur Weiterführung der Reaktion wieder in den Modellreaktor eingebracht.

Um den Fortgang der enzymatischen Lactose-Spaltung gut verfolgen zu können, werden für Experiment 24 b) halbquantitative Teststäbchen eingesetzt (z. B. „Diabur-Test® 5000 Glucose“, Firma Roche Diagnostics), mit denen sich die Glucose-Konzentrationen im Reaktionsmilieu jeweils ungefähr abschätzen lassen.

Wie die in Tabelle 20 zusammengestellten Ergebnisse aus Experiment 24 b) zeigen, vermag die in Calciumalginat immobilisierte β -Galactosidase Lactose in ihre Monosaccharid-

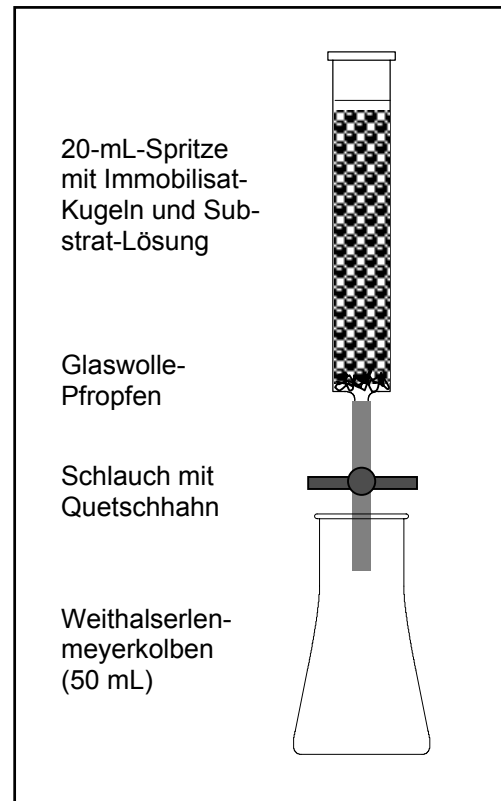


Abb. 48: Modellreaktor für die vereinfachte Lactose-Hydrolyse mit in Calciumalginat immobilisierter β -Galactosidase (Experiment 24 b)).

Bausteine D-Glucose und D-Galactose zu spalten. Mit fortschreitender Reaktionszeit nehmen die Glucose-Gehalte in H-Milch und Molke zu.

Tab. 20: Typische Ergebnisse der Lactose-Spaltung mit Calciumalginat- β -galactosidase-Immobilisaten (Experiment 24 b)).

t in min	Glucose-Gehalt in g/100 mL ^a		
	H-Milch	Molke	Lactose-Lösung ($\rho^* = 50 \text{ g/L}$) ^b
0	0	0	0
5	knapp 0,1	0,25 – 0,5	0,1 – 0,25
10	0,10 – 0,25	0,5 – 1	0,25 – 0,5
15	0,25 – 0,5	1 – 2	0,25 – 0,5

^a Den verschiedenfarbigen Feldern auf der Farbskala der Packung mit Glucose-Teststreifen sind jeweils die in der Tabelle angegebenen Konzentrationsbereiche zugeordnet.

^b Der Lactose-Gehalt von Kuhmilch beträgt durchschnittlich etwa 4,6 – 5 % (Falbe/Regitz 1995 d, S. 2789). Aus diesem Grund wird im Versuch eine Lösung verwandt, deren Massenkonzentration an Lactose bei $\rho^* = 50 \text{ g/L}$ liegt.

Die Versuchsteile c) und d) haben das Ziel, die wesentlichen Vor- und Nachteile von Calciumalginat als Trägermaterial für die Enzym-Immobilisierung aufzuzeigen.

In Experiment 24 c) wird zunächst untersucht, ob die eingesetzte β -Galactosidase wirklich quantitativ in der Gelmatrix aus Calciumalginat zurückgehalten wird. Zu diesem Zweck überprüft man eine 10-mL-Probe des in Versuchsteil a) für die Herstellung des Immobilisates verwandten Gelierbades nach Versetzen mit 0,526 g Lactose-Monohydrat auf β -Galactosidase-Aktivität. Die Ausgangskonzentration an Lactose beträgt in diesem Reaktionsansatz $\rho^* = 50 \text{ g/L}$.

Wie Tabelle 21 zeigt, findet auch im Gelierbad die enzymatische Hydrolyse des Disaccharids statt, wenn auch deutlich langsamer als in der gleich konzentrierten Lactose-Lösung die mit dem β -Galactosidase-Immobilisat in Kontakt gebracht wurde (vgl. Tabelle 20). Es wird also nur ein Teil des immobilisierten Enzyms permanent im Calciumalginat-Gel eingeschlossen.

Tab. 21: Experiment 24 c): Überprüfung der β -Galactosidase-Aktivität im mit Lactose versetzten Gelierbad des Immobilisierungsversuches.

t in min	Glucose-Gehalt im Gelierbad in g/100 mL ^a
5	0
10	0
15	0 – 0,1

^a Vgl. Anmerkung a in Tabelle 20.

Im letzten Teilversuch von Experiment 24 sollen nicht immobilisierte und in Calciumalginat-Gel eingeschlossene β -Galactosidase hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität und Abtrennbarkeit vom Reaktionsmedium miteinander verglichen werden.

Für die Untersuchung der Hydrolyse-Leistung verwendet man Lactose-Lösung ($\rho^* = 50 \text{ g/L}$) als Substrat. Um den Fortgang der Spaltung des Disaccharids in seine Bausteine zu überprüfen, werden wiederum halbquantitative Glucose-Teststäbchen eingesetzt.

Wie die Versuchsergebnisse in Tabelle 22 deutlich machen, verfügt das freie Enzym über eine deutlich höhere Hydrolyse-Aktivität als die Immobilisat-Kugeln.

Tab. 22: Experiment 24 d): Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von nicht immobilisierter und in Calciumalginat-Gel eingeschlossener β -Galactosidase.

t in min	Glucose-Gehalt in g/100 mL ^a	
	Ansatz 1: • Inhalt einer β -Galactosidase-Kapsel • 10 mL Lactose-Lösung	Ansatz 2: • β -Galactosidase-Immobilisat aus Experiment 24 a) mit gleicher Enzym-Menge • 10 mL Lactose-Lösung
0	0	0
5	1	0,25
10	1 – 2	0,25 – 0,5
15	knapp 2	knapp 0,5

^a Den verschiedenfarbigen Feldern auf der Farbskala der Packung mit Glucose-Teststreifen sind jeweils die in der Tabelle angegebenen Konzentrationsbereiche zugeordnet.

Als mögliche Ursachen für die eingeschränkte Spaltleistung der immobilisierten β -Galactosidase sind folgende Faktoren zu nennen:

- Die Calciumalginat-Matrix wirkt als Diffusionsbarriere für das Substrat und die Spaltprodukte der enzymatischen Hydrolyse, wodurch sich – zumindest anfangs – die Reaktionsgeschwindigkeit verringert.
- Im Rahmen des Immobilisierungsprozesses kann die eingesetzte β -Galactosidase z. B. durch Konformations-Änderungen geschädigt werden.
- Aufgrund der Tatsache, dass das Enzym nicht vollständig im Gel eingeschlossen wird, entstehen Biokatalysator-Verluste.

Im zweiten Teil von Experiment 24 d) wird dann auf einfache Weise demonstriert, dass immobilisierte β -Galactosidase trotz ihrer geringeren Hydrolyse-Aktivität einen entscheidenden Vorzug gegenüber dem freien Enzym aufweist:

Während sich die Immobilisat-Kugeln auf einfachste Weise mit einem Haushaltssieb vom Reaktionsgemisch abtrennen lassen, können die feinen Partikel des freien Enzyms selbst in einem Faltenfilter nicht zurückgehalten werden. Man erhält ein getrübbtes Filtrat (vgl. auch Abbildung 49).

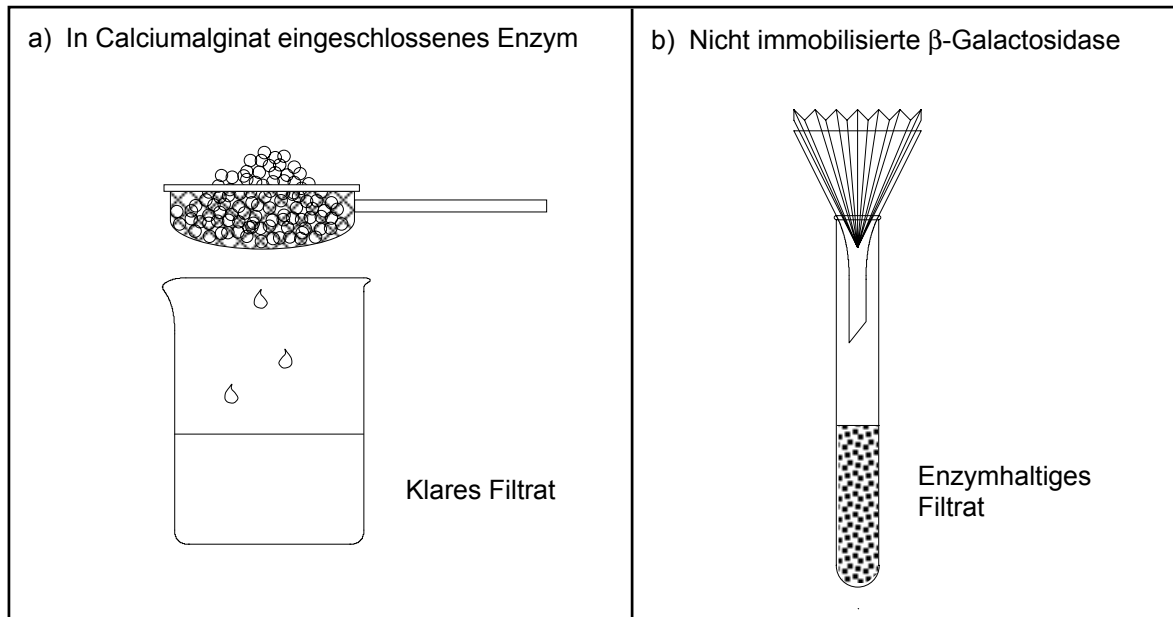


Abb. 49: Abtrennung in Calciumalginat-Gel eingeschlossener und nicht immobilisierter β -Galactosidase vom Reaktionsgemisch (Experiment 24 c)).

Das Versuchsergebnis zeigt, dass immobilisierte Enzyme gut vom Reaktionsansatz separierbar und somit mehrfach einsetzbar sind. Da es sich bei β -Galactosidase um ein relativ teures Enzym handelt, kann dieser Aspekt auf keinen Fall vernachlässigt werden, wenn man einen industriellen Einsatz in Betracht zieht.

2.6.4 Medizin und Pharmazie

2.6.4.1 Überblick

Auch auf dem medizinisch-pharmazeutischen Sektor gibt es inzwischen zahlreiche Einsatzmöglichkeiten für Alginat, die vor allem auf dem besonderen Sol- und Gelbildungsverhalten dieser Algenpolysaccharide basieren. Eine wichtige Rolle spielt zudem die Kationenaustauschfähigkeit der Polysaccharid-Derivate aus Braunalgen, auf die später noch genauer eingegangen wird.

Tabelle 23 gibt einen Einblick in das Anwendungsspektrum von Alginaten in der Medizin und Pharmazie und macht deutlich, welche ihrer charakteristischen Eigenschaften dabei jeweils von Bedeutung sind:

Tab. 23: Wichtige Anwendungen der Alginat auf dem medizinisch-pharmazeutischen Sektor (Firma Pronova Biopolymer, S. 18 – 25; Onsøyen 1996, S. 26 – 31; Steinegger/Hänsel 1992, S. 138 – 140).

Anwendung	Ausgenutzte Eigenschaften
Wundauflagen	Sol- und Gelbildung, Kationenaustausch
Dentalabdruckmassen	Sol- und Gelbildung
Arzneimittel gegen Sodbrennen	Sol- und Gelbildung
Dekorporierung von radioaktivem ^{90}Sr	Gelbildung, Kationenaustausch
Kontrollierte Freisetzung von medizinischen Wirkstoffen (Retard-Tabletten)	Sol- und Gelbildung, Kationenaustausch

In der vorliegenden Arbeit erfolgt eine detaillierte Auseinandersetzung mit den vier erstgenannten Anwendungen aus Tabelle 23. Die damit verbundenen Inhalte wurden teilweise bereits in Marburger/Gerstner (2000, S. 22 – 30) und Marburger (2002 b, S. 27– 35) veröffentlicht:

In der modernen Wundtherapie werden Verbandstoffe aus Calciumalginat-Fasern verwendet, die durch Aufrechterhaltung eines idealfeuchten Wundmilieus die Neubildung von Gewebe fördern und Infektionen vorbeugen.

Des Weiteren sind Alginat funktionell wichtige Bestandteile von Dentalabdruckmassen, mit deren Hilfe in der Zahnarztpraxis schnell und einfach Abformungen von den Zähnen und Kiefern der Patienten hergestellt werden können. Diese Dentalabdrücke dienen dann z. B. als Grundlage für die Anfertigung von Zahnersatz.

Der dritte bedeutende Einsatzzweck der Algenpolysaccharide, der hier diskutiert werden soll, besteht in der Verwendbarkeit von Alginaten oder Alginsäure in Arzneimitteln gegen Sodbrennen. Diese Therapeutika verhindern auf der Basis eines chemisch-physikalischen Wirkungsmechanismus, dass die empfindliche Speiseröhrenschleimhaut durch aufsteigenden sauren Mageninhalt geschädigt wird.

Schließlich ist Calciumalginat auch von Relevanz für die medizinische Behandlung von Patienten, die z. B. nach Kernwaffenexplosionen oder Reaktorstörfällen hohen Belastungen des Knochenkrebs erzeugenden β -Strahlers ^{90}Sr ausgesetzt sind. Bei oraler Applikation verhindert das Algenpolysaccharid durch einen In-Vivo-Ionenaustauschvorgang nicht nur, dass über die Nahrung in den Organismus gelangendes radioaktives Strontium in die Knochensubstanz eingebaut wird, sondern es kann sogar die Dekorporierung von bereits im Knochen deponiertem ^{90}Sr herbeiführen.

In Tabelle 23 sind außerdem noch Retard-Tabletten als weitere medizinisch-pharmazeutische Anwendung der Alginat aufgeführt. Dabei handelt es sich um Medikamente, aus denen Wirkstoffe kontrolliert innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls herausdiffundieren. Sobald die Tablette mit einer wässrigen Körperflüssigkeit, wie z. B. Speichel, in Kontakt kommt, entsteht langsam eine viskose Hydrokolloid-Matrix, in der sich das therapeutische Agens löst. Im sauren Milieu des Magens bildet sich daraus ein schwerlösliches Alginsäure-Gel mit Porenstruktur, das sich dann bei den im Darm vorherrschenden höheren pH-Werten durch Ionenaustauschvorgänge wieder partiell in ein zähflüssiges Sol umwandelt. Durch gezielte Modifizierung der funktionellen Eigenschaften der Sole und Gele kann man steuern, unter welchen pH-Bedingungen und mit welcher Geschwindigkeit die in den Tabletten enthaltenen Wirkstoffe freigesetzt werden (Firma ISP 2001 a; Onsøyen 1996, S. 31).

2.6.4.2 Wundauflagen aus Calciumalginat-Fasern

Herstellung

Seit Mitte der achtziger Jahre werden zur Wundbehandlung verstärkt Verbandstoffe eingesetzt, die aus Calciumalginat-Fasern bestehen (Teschner 1996, S. 22). Industriell lassen sich solche Fasern ganz einfach dadurch herstellen, dass man viskoses Natriumalginat-Sol durch feine Düsen in ein Bad aus Calciumchlorid-Lösung extrudiert (Lang 2000, S. 24; Teschner 1996, S. 22).

Bei Kontakt des Natriumalginat-Sols mit dem Gelierbad bilden sich spontan fadenförmige, faserartige Strukturen aus Calciumalginat-Gel. Der damit verbundene Gelbildungsprozess wurde bereits mehrfach diskutiert.

In der Industrie werden die erhaltenen Calciumalginat-Fasern gespült, entwässert und zu einem nicht gewebten, lockeren Faserverbund verarbeitet, den man als Vlies in einer Vielzahl verschiedenartiger Wundauflagen einsetzen kann (Firma Braun a; Firma Hartmann;

Lang 2000, S. 24). Abbildung 50 zeigt Calciumalginat-Fasern in etwa 30-facher Vergrößerung und eine Auswahl von Verbandstoffen, in denen sie Verwendung finden.

Ein typisches Calciumalginat-Vlies der Größe 10 x 10 cm besteht aus rund 100.000 Einzelfasern mit Durchmessern von jeweils etwa 15 μm . Legt man diese Calciumalginat-Fasern Ende an Ende, so beträgt die Länge der resultierenden Strecke mehr als 5 km (Firma Acordis).

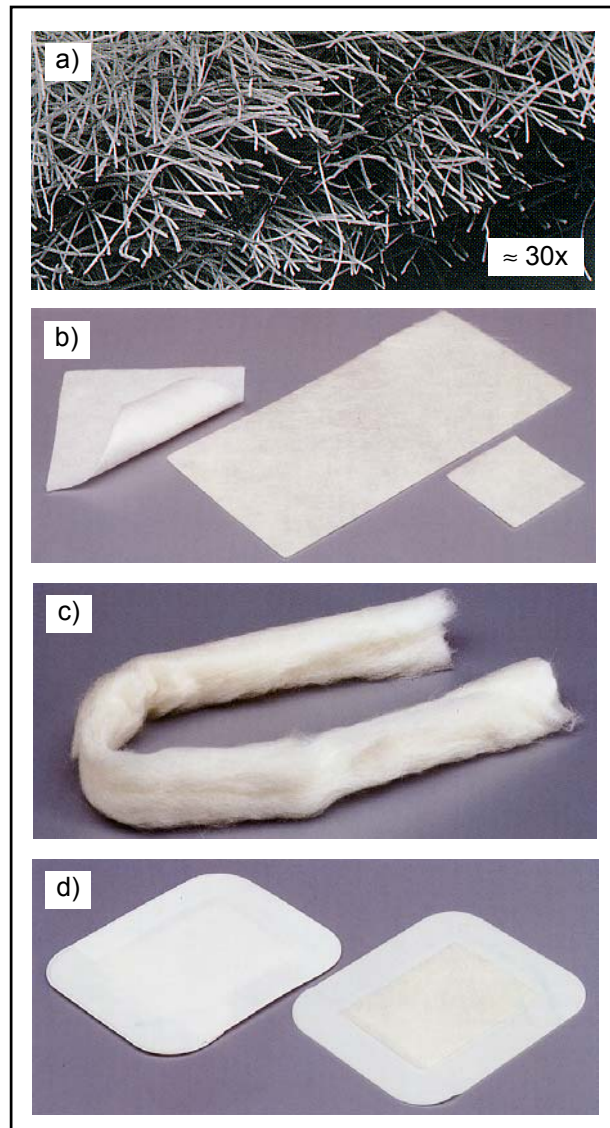


Abb. 50: a) Calciumalginat-Fasern in ca. 30-facher Vergrößerung und Beispiele für Wundauflagen, in denen sie verwandt werden: b) Komresse, c) Tamponade und d) Pflaster (aus Firma Braun a, b; verändert).

Anwendung und Wirkungsweise

Wundauflagen aus Calciumalginat eignen sich in erster Linie für die Therapie von Wunden mit mittelstarker Exsudatbildung. Während flache Wunden in Abhängigkeit von der Größe entweder mit Pflastern oder Kompressen abgedeckt werden, erfolgt die Behandlung tieferer Verletzungen, wie z. B. Abszesse und Fisteln, durch Einbringen von Tamponaden (Firma Braun a; Firma Hartmann; Teschner 1996, S. 22, 25 f.).

Die Wirkungsweise von Verbandstoffen aus Calciumalginat wird in Abbildung 51 am Beispiel einer Wundtamponade verdeutlicht:

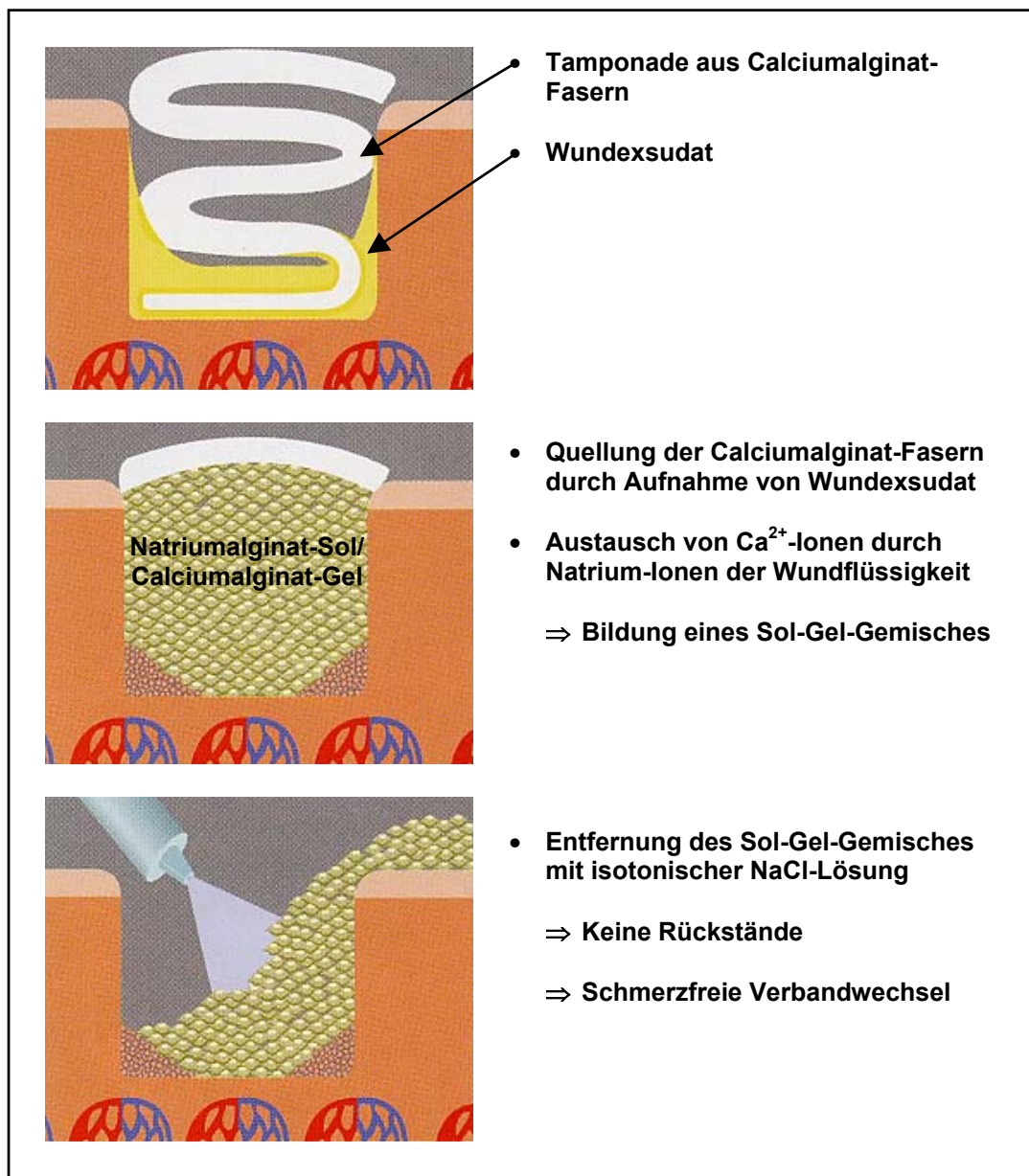


Abb. 51: Wirkungsweise einer Calciumalginat-Tamponade für tiefe Wunden mit relativ starker Sekretbildung (aus Firma Braun a; verändert).

Kommen die trockenen Calciumalginat-Fasern in Kontakt mit der nässenden Wunde, so absorbieren sie durch Kapillareffekte Wundflüssigkeit und quellen auf. Dabei bildet sich ein stark wasserhaltiges Calciumalginat-Gel in dem auch Zelldetritus und Bakterien eingeschlossen werden.

Die Calcium-Ionen in den Fasern werden zudem sukzessive durch die im Wundexsudat und im Blut enthaltenen Natrium-Ionen ausgetauscht. Das bei dem Ionenaustauschprozess entstehende Gemisch aus Natriumalginat-Sol und Calciumalginat-Gel weist Eigenschaften auf, die sich förderlich auf die Wundheilung auswirken. Aufgrund seiner besonderen Konsistenz schützt es unter Erhalt der Gaspermeabilität die Wunde vor Austrocknung. Dadurch wird ein idealefeuchtes Wundmilieu mit günstigem Mikroklima geschaffen, das den Neuaufbau von Gewebe unterstützt und die Infektionsgefahr verringert (Firma Braun a; Firma Hartmann; Lang 2000, S. 24 f.; Teschner 1996, S. 22, 25 f.). Das Calciumalginat-Vlies wird in der Regel so lange in der Wunde belassen, bis sich seine Fasern komplett in ein Gemisch aus Calciumalginat-Gel und Natriumalginat-Sol umgewandelt haben. Aufgrund seiner gelartigen Beschaffenheit verklebt das Verbandmaterial nicht mit dem Wundgrund, sondern lässt sich in der Regel als Ganzes mit Hilfe einer Pinzette entfernen. Eine besonders rückstands- und schmerzfreie Möglichkeit des Verbandwechsels besteht darin, die Wunde mit isotonischer NaCl-Lösung ($w = 0,941 \%$) zu spülen. Durch einen Ionenaustauschvorgang werden hierbei auch noch nicht aufgelöste Calciumalginat-Fasern in ein Sol-Gel-Gemisch überführt, das man dann einfach aus der Wunde herausspülen kann. Irritationen des nachwachsenden Gewebes bleiben auf diese Weise völlig aus (Firma Braun a; Firma Hartmann; Lang 2000, S. 25; Teschner 1996, S. 25 f.).

Klinische Untersuchungen haben gezeigt, dass Calciumalginat-Wundauflagen über weitere positive Eigenschaften verfügen (Firma Braun a; Firma Hartmann; Teschner 1996, S. 22, 25 f.):

Wegen ihrer lockeren, weichen Faserstruktur passen sich diese Verbandstoffe besonders gut problematischen Wundkonturen, wie z. B. tiefen und zerklüfteten Höhlen, an. Außerdem zeichnen sie sich durch eine gute Verträglichkeit und niedrige allergene Sensibilisierung aus.

Da bei Kontakt der Calciumalginat-Fasern mit der Wundflüssigkeit Calcium-Ionen freigesetzt werden, die die Bildung von Prothrombin induzieren, haben Wundauflagen aus diesem Material zudem einen hämostatischen Effekt.

Schließlich tragen Therapeutika aus Calciumalginat noch zur Keimreduktion in der Wunde bei: Eine bakterizide Wirkung besteht zwar nicht, aber das keimbelastete Exsudat wird in dem aus den Fasern entstehenden Sol-Gel-Gemisch eingeschlossen und somit bei jedem Verbandwechsel entfernt.

Trotz aller Vorzüge gibt es auch einige Indikationseinschränkungen für Wundauflagen aus Calciumalginat (Teschner 1996, S. 25 f.):

Obwohl Calciumalginat-Fasern über relativ hohe Absorptionskapazitäten von etwa 10 mL Wundexsudat pro Gramm Vliesgewicht verfügen, müssen bei stark sezernierenden Wunden so häufig Verbandwechsel durchgeführt werden, dass in solchen Fällen die Wundtherapie mit Calciumalginaten aus Personal- und Kostengründen nicht tragbar ist.

Andererseits lassen sich auch Wunden ohne Sekretion nur schwierig mit Algenpolysaccharid-Auflagen behandeln: Durch die Abwesenheit von Exsudat werden hier die Calciumalginat-Fasern nicht – wie für die feuchte Wundtherapie erforderlich – in ein Sol-Gel-Gemisch überführt. Um unter diesen Bedingungen dennoch Wundbehandlungen mit Calciumalginat-Vlies durchführen zu können, muss man die Verbände permanent mit isotonischer Kochsalz-Lösung durchfeuchten.

Experimentelle Veranschaulichung

Mit dem Ziel, die industrielle Herstellung von Calciumalginat-Fasern auf möglichst einfache Weise für Schüler nachvollziehbar zu machen, wurde im Rahmen der Arbeit Experiment 25 a) konzipiert. Der Versuch stellt eine Abwandlung der von Lütke Twenhöven (1997, S. 43) vorgeschlagenen Labormethode dar, die in einem anderen thematischen Zusammenhang veröffentlicht wurde.

Als zweiter Versuchsteil (Experiment 25 b)) wurde eine analytische Methode erarbeitet, mit der sich handelsübliche Calciumalginat-Pflaster auf ihre funktionsgebenden Bestandteile untersuchen lassen: Durch eine Ionenaustauschreaktion mit Salzsäure ($c = 4 \text{ mol/L}$) überführt man zunächst die Calciumalginat-Fasern der Wundauflage in Alginsäure. Die bei diesem Vorgang freigesetzten Calcium-Ionen lassen sich dann bei $\text{pH} \approx 5$ durch Ausfällung von Calciumoxalat nachweisen. Für die Testreaktion auf Alginat wird eine wässrige Aufschlammung von Alginsäure-Fasern mit festem NaHCO_3 zu Natriumalginat-Sol umgesetzt. Durch Einbringen des Sols in eine verdünnte Calciumchlorid-Lösung erhält man schließlich ein schwerlösliches Calciumalginat-Gel.

2.6.4.3 Dentalabdruckmassen auf Alginat-Basis

Allgemeine Aspekte

Unter Dentalabdrücken versteht man möglichst präzise Abformungen des Kiefers, der Zähne und des Zahnfleischs. Sie stellen das Bindeglied zwischen der Arbeit des Zahnarztes und des Zahntechnikers dar und sind die Voraussetzung für die Anfertigung eines gut sitzenden Zahnersatzes. Die Herstellung von Abdrücken wird nach folgendem Prinzip vorgenommen: Zunächst beschickt der Zahnarzt einen an die Mundverhältnisse des Patienten angepassten Materialträger, den so genannten Abdrucklöffel, mit einer Abdruckmasse und drückt ihn auf die darzustellenden anatomischen Strukturen. Der dabei erhaltene Negativabdruck wird dann mit speziellen Hartgipsen ausgegossen. Es resultiert ein positiver Gipsabdruck, der vom Zahntechniker weiterverarbeitet werden kann (de Cassan 2001; Rehberg 1987, S. 284).

Eine der heute gebräuchlichsten Abformmethoden besteht in der Verwendung elastischer Materialien, wie z. B. Agar, Alginat, Polysulfide, Silikone und Polyether. Diese haben den entscheidenden Vorteil, dass sie erst im Mund des Patienten aushärten und aufgrund ihrer Elastizität ohne Probleme wieder entfernt werden können (de Cassan 2001; Rehberg 1987, S. 286 – 289). Im Folgenden sollen alginathaltige Abdruckmassen näher betrachtet werden.

Zusammensetzung und Wirkungsweise

Abformmaterialien auf Alginat-Basis sind seit etwa 1942 auf dem Markt und kommen als pulverförmige Mischungen in den Handel (Rehberg 1987, S. 284). Sie müssen vom Zahnarzt nur noch in einem bestimmten Verhältnis mit Wasser angerührt werden, bevor sie für die Anfertigung von Dentalabdrücken einsetzbar sind. Tabelle 24 gibt Auskunft über die typischen Inhaltsstoffe eines alginathaltigen Abdruckpulvers:

Tab. 24: Zusammensetzung eines handelsüblichen Dentalabdruckpulvers auf Alginat-Basis (Firma ISP Alginate a, S. 1).

Funktionen	Hauptinhaltsstoffe		Massengehalt (%)
		Eingesetzte Substanzen	
Gelbildner		Wasserlösliches Alginat (z. B. Na ⁺ -Salz)	16,5
Ca ²⁺ -Quelle		CaSO ₄ · 2 H ₂ O	15,0
Retarder		Na ₄ P ₂ O ₇	≤ 3,0
pH-Modifikator (alkalisch)		ZnO	4,0
Füllstoff		Kieselgur	61,5

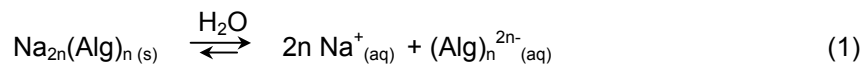
Die Funktionen der Komponenten einer alginathaltigen Dentalabdruckmischung sollen im Folgenden näher erläutert werden (Firma FMC BioPolymer 2001; Firma ISP Alginates a, b; Onsøyen 1996, S. 30 f.; Rehberg 1987, S. 287; Tesk et al. 1993, S. 1000 f.). Die damit im Zusammenhang stehenden chemischen Vorgänge werden in Abbildung 52 zusätzlich mit Hilfe von Reaktionsgleichungen zusammengefasst.

Als Gelbildner enthalten die Dentalabdruckpulver auf Alginat-Basis Na^+ -, K^+ -, NH_4^+ - oder Triethanolammonium-Salze des Polysaccharid-Derivats, die sich in kaltem Wasser lösen und in Gegenwart von Calcium-Ionen feste, aber elastische Gele bilden.

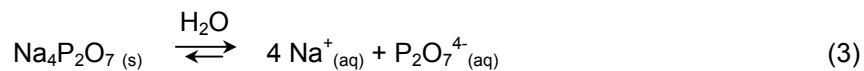
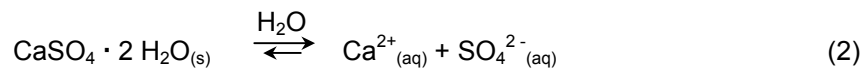
Damit die Gelbildung nicht spontan bei Kontakt des Pulvers mit Wasser einsetzt, wird als Calcium-Quelle ein relativ schwerlösliches Salz, wie z. B. Gips, verwandt.

Reaktionen bei Mischung des Dentalabdruckpulvers mit Wasser

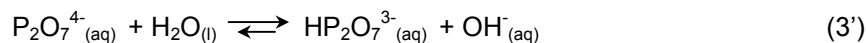
- (Partielle) Auflösung der Salze und sekundäre Reaktionen von Anionen-Basen mit Wasser



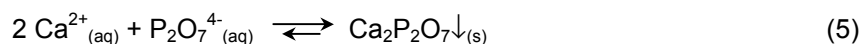
($\text{Alg}^{2-} = \text{GG}^{2-}, \text{MM}^{2-}, \text{GM}^{2-}, \text{MG}^{2-}$)



Sekundäre Säure-Base-Reaktionen:



- Verzögerung der Ca^{2+} -Freisetzung durch den Retarder



- Kontrollierte Bildung eines Calciumalginat-Gels

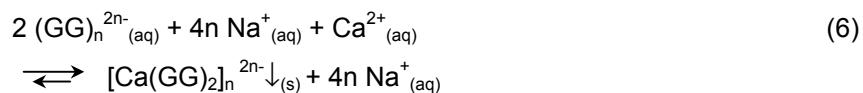


Abb. 52: Übersicht über die Vorgänge, die nach Anrühren einer typischen Dentalabdruckmischung mit Wasser vonstatten gehen (Firma FMC BioPolymer 2001; Rehberg 1987, S. 287; verändert).

Die Konzentration an freien Calcium-Ionen wird zusätzlich durch einen sogenannten Retarder, in der Regel Natriumdiphosphat, niedrig gehalten. Aufgrund der Tatsache, dass $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ über ein kleineres Löslichkeitsprodukt als $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ verfügt, fangen $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ -Anionen zunächst einen Teil der aus dem Gips in Lösung gehenden Ca^{2+} -Ionen unter Bildung eines schwerlöslichen Calciumdiphosphat-Niederschlages ab. Die in Lösung verbleibenden Calcium-Ionen induzieren dann langsam und kontrolliert die Bildung eines homogenen Calciumalginat-Gels.

Durch diesen Vorgang werden den Lösungsgleichgewichten freie Ca^{2+} -Ionen entzogen. Gemäß dem Prinzip von Le Chatelier reagieren die Systeme darauf, indem aus den schwerlöslichen Niederschlägen ($\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) wiederum Calcium-Ionen freigesetzt werden. In einigen Präparaten wird anstelle von Natriumdiphosphat auch tertiäres Natriumphosphat als Retarder eingesetzt (vgl. z. B. „tricolor-algin NF“, Firma Müller-Dental 2001). In diesem Fall beruht die Verzögerung der Gelbildung ebenfalls darauf, dass die aus dem Gips in Lösung gehenden Calcium-Ionen zunächst in Form eines schwerlöslichen Niederschlages (hier: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) gebunden werden.

Neben den bisher genannten Komponenten enthalten die Dentalabdruckmischungen noch pH-Modifikatoren. Wird beispielweise Zinkoxid zugesetzt, so ruft diese Substanz aufgrund ihrer alkalischen Reaktion mit Wasser eine Erhöhung des pH-Wertes im Reaktionsgemisch hervor. Folglich liegen weniger Diphosphat-Anionen in protonierter Form vor, und es kommt zu einer vollständigeren Ausfällung von $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

In manchen Produkten werden zur Modifizierung des pH-Wertes auch Substanzen mit saurer Wirkung eingesetzt. Gebräuchlich ist hier beispielsweise Kaliumhexafluorotitanat(IV) ($\text{K}_2[\text{TiF}_6]$) (Firma ISP Alginates b; Firma Müller-Dental 2001; Onsøyen 1996, S. 31). Auf die Bedeutung dieses Stoffes für Abdruckmassen mit Farbindikatoren wird später noch genauer eingegangen (vgl. Experimentelle Veranschaulichung).

Als chemisch inerte Komponenten finden sich in alginathaltigen Dentalabdruckmischungen Füllstoffe, wie z. B. Kieselgur. Diese haben vor allem die Funktion, die Festigkeit der Abdruckmasse aus Calciumalginat-Gel zu erhöhen, aber dienen auch dazu, das Vermischen des Dentalabdruckpulvers mit Wasser zu erleichtern.

Schließlich fügt man den Dentalabdruckmischungen noch Geschmacks- und Farbstoffe zu. Während erstere dazu beitragen, die Zahnbehandlung etwas angenehmer für den Patienten zu machen, helfen letztere dem Zahnarzt, Alginat-Abdruckmassen mit unterschiedlichen Gelbildungseigenschaften optisch besser voneinander zu unterscheiden.

Anwendung in der Zahnarztpraxis

Nachdem im Vorangehenden die Zusammensetzung und Wirkungsweise von Dentalabdruckmassen auf Alginat-Basis diskutiert wurde, soll nun noch verdeutlicht werden, wie in der Zahnarztpraxis unter Einsatz kommerziell erhältlicher Produkte (hier: „Accu-Dent[®] System 2, Teilprothetik“, Firma Candulor) Dentalabdrücke hergestellt werden.

Die Fotoserie in Abbildung 53 zeigt ausgewählte Arbeitsschritte, die bei der Vorbereitung der Abdruckmassen sowie der Anfertigung des Abdrucks für eine obere Teilprothese durchzuführen sind (Firma Candulor). Im Text wird auf die abgedruckten Bilder Bezug genommen.

Vorbereitend mischt man zwei Dentalabdruckmassen mit unterschiedlicher Konsistenz und Funktion an: zunächst das leicht verformbare Spritzen-Gel, das in den Mund des Patienten eingespritzt werden kann und anschließend das festere Löffel-Gel, das auf den Abdrucklöffel aufgebracht wird und die stützende Grundlage für den Abdruck bildet.

Dazu wird zunächst jeweils die vorgeschriebene Menge Wasser abgemessen und in eine flexible Mischschüssel gegeben (Bild a)). Danach fügt man das entsprechende Dentalabdruckpulver hinzu (Bild b)) und verrührt 15 – 20 Sekunden gründlich mit einem Spatel. Das Anmischen des Spritzen-Gels erfolgt immer zuerst, da dessen Verarbeitungszeit von etwa dreieinhalb Minuten um ca. 30 Sekunden länger ist als die des Löffel-Gels.

Das fertige Spritzen-Gel wird in eine Spritze eingebracht, die mit einem Applikator aus Silikon versehen ist (Bilder c) und d)). Dieser speziell für die Dentalabdrucktechnik entwickelte Spritzenaufsatz erleichtert die präzise Applikation des Gels auf den Zähnen und dem Zahnfleisch.

Danach beschickt man einen Dentalabdrucklöffel mit dem angemischten Löffel-Gel (Bild e)). Nach manuellem Verstreichen der Gelmasse und Glätten der Oberfläche durch Abspülen unter kaltem, fließendem Wasser ist der Löffel einsatzfähig für die Anfertigung eines oberen Abdrucks (Bild f)).

Die Anwendung der beiden verschiedenen Gelabdruckmassen geht dann wie folgt vorstatten: Nachdem im Oberkiefer die Zähne, das Zahnfleisch sowie die Gaumenwölbung mittels eines Verbandsmull-Schwämmchen trocken gewischt wurden, bringt man das Spritzen-Gel unter Einsatz des Applikators möglichst gleichmäßig und luftblasenfrei auf die oberen, hinteren und vorderen Zahnoberflächen auf (Bild g)).

Anschließend wird der Rest des Spritzen-Gels ohne Aufsatz beidseitig in die Vestibula sowie in die vordere Gaumenwölbung eingespritzt (Bild h)).

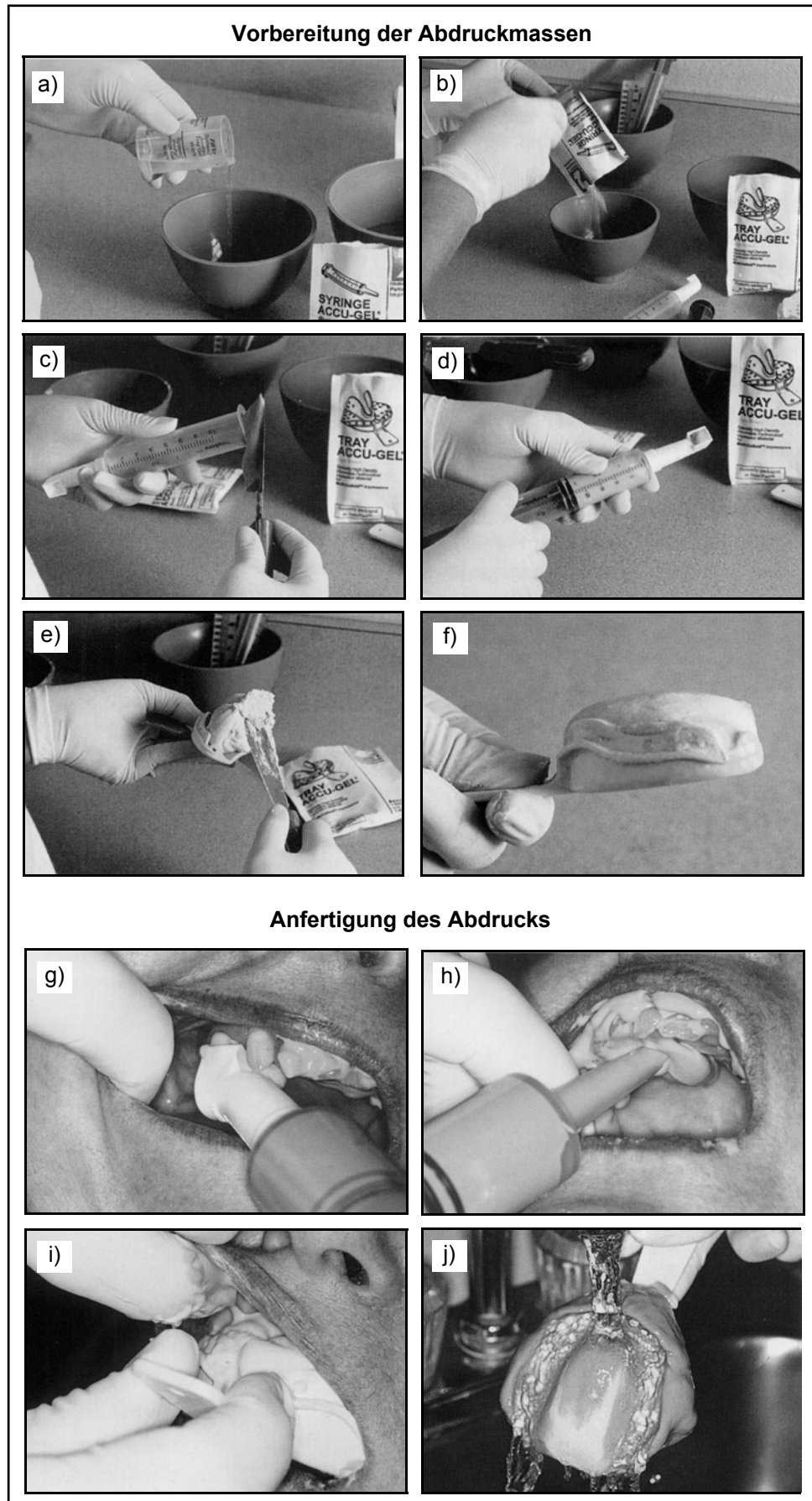


Abb. 53: Auswahl von Arbeitsschritten bei der Herstellung eines Calciumalginat-Abdrucks für eine obere Teilprothese (Firma Candulor; verändert).

Daraufhin bringt man den mit Löffel-Gel versehenen Abdrucklöffel in den Mund des Patienten ein (Bild i)) und schiebt ihn so weit nach oben, bis sich das Spritzen- mit dem Löffel-Gel verbindet. Schließlich wird nach Abbinden der Materialien der Dentalabdruck vorsichtig gelöst und entfernt. Um Deformationen durch Eintrocknen der Gelmassen zu vermeiden, spült man den fertigen Abdruck unter fließendem, kaltem Wasser ab (Bild j)) und wickelt ihn locker in ein nasses Papierhandtuch ein.

Da die Alginat-Abformung nicht lange lagerbeständig ist, sollte das Ausgießen mit Gips sobald wie möglich erfolgen (Firma Candulor).

Im Vergleich zu Silikon- oder Polyether-Abformungen sind Calciumalginat-Abdrücke zwar nicht besonders detailgetreu, aber ihre Genauigkeit reicht für viele Anwendungen völlig aus (Rehberg 1987, S. 287). Aufgrund ihrer zahlreichen positiven Eigenschaften haben sich alginathaltige Abdruckmassen in der Praxis besonders bewährt (Onsøyen 1996, S. 31; Rehberg 1987, S. 287):

- Alginate, die auch als Lebensmittelzusatzstoffe eingesetzt werden, gelten als gesundheitlich unbedenklich. Sie sind weder toxisch noch mutagen oder cancerogen und lösen normalerweise auch keine Schleimhautirritationen aus.
- Alginathaltige Abdruckmassen können ohne großen Arbeitsaufwand angemischt werden und lassen sich relativ einfach handhaben.
- Durch die schnelle Gelbildung der Dentalabdruckmischungen bei Raumtemperatur lassen sich unangenehme Wartezeiten für die Patienten vermeiden.
- Nicht zuletzt bestechen Dentalabdrücke auf Alginat-Basis auch durch ihre Kostengünstigkeit.

Experimentelle Veranschaulichung

Um den Wirkungsmechanismus und die Anwendung von Dentalabdruckmassen auf Alginat-Basis zu veranschaulichen, wurden zwei schulgeeignete Versuche entwickelt:

Experiment 26 verdeutlicht die Zusammensetzung und Funktion einer alginathaltigen Dentalabformmasse anhand eines einfachen Modellsystems. Zunächst mischen die Lernenden selbst ein Dentalabdruckpulver an und bringen es anschließend mit Wasser zur Reaktion. In die resultierende Gelmasse auf Calciumalginat-Basis wird ein Vampirgebiss eingedrückt, um deren Tauglichkeit als Zahnabdruckmedium zu überprüfen.

Zur Erleichterung der Handhabung kommen in pulverförmigen Alginat-Abformmaterialien gelegentlich auch Farbindikatoren zum Einsatz. So enthält beispielsweise das Dreiphasen-Produkt „tricolor-algin NF“ der Firma Müller-Dental Phenolphthalein und Thymolphthalein. Durch Farbwechsel signalisiert diese Abdruckmischung dem Zahnarzt das Ende der Anrührphase sowie die Zeitpunkte, zu denen der Abdrucklöffel mit Calciumalginat-Masse beschickt bzw. in den Mund des Patienten eingebracht werden muss (Firma Müller-Dental 2001 a, b).

Experiment 27 veranschaulicht, wie man eine Dentalabdruckmischung mit Farbindikatoren, die in ihrer Zusammensetzung etwa dem Produkt der Firma Müller-Dental entspricht, selbst herstellen und auf Abdruckfähigkeit untersuchen kann (Firma Müller Dental 2001 a, b). Die chemischen Hintergründe des Versuches sollen im Folgenden näher betrachtet werden:

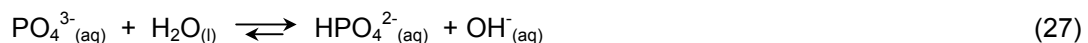
Die Umschlagsbereiche und Farbwechsel der in der Dentalabdruckmischung enthaltenen pH-Indikatoren sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Tab. 25: Eigenschaften der eingesetzten pH-Indikatoren (Falbe/ Regitz 1995 d, f).

pH-Indikator	Umschlagsbereich	Farbumschlag
Phenolphthalein	pH = 8,4 – 10,0	farblos → rotviolett
Thymolphthalein	pH = 8,8 – 10,5	farblos → blau

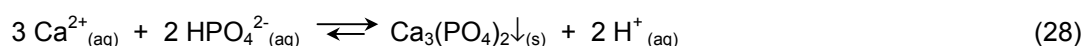
Während der Anrührzeit ist „tricolor-algin NF“ violett gefärbt (Phase 1). Im Anschluss daran erfolgt ein Farbwechsel nach rotviolett. Dies signalisiert dem Zahnarzt, dass er nun den Abdrucklöffel mit der Masse beschicken muss (Phase 2). Sobald das Abformmaterial weiß wird, ist es in den Mund des Patienten einzubringen (Phase 3) (Firma Müller Dental 2001 a, b).

Die beschriebenen Farbwechsel lassen sich folgendermaßen deuten: In der Abdruckmischung sind der Retarder Na_3PO_4 und der pH-Modifikator $\text{K}_2[\text{TiF}_6]$ enthalten. Nach Anmischen mit Wasser herrscht in der Masse aufgrund der alkalischen Reaktion der in Lösung gehenden Phosphat-Anionen zunächst ein hoher pH-Wert vor:

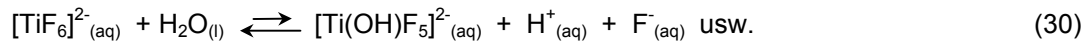


Unter diesen Bedingungen liegen beide pH-Indikatoren in ihren deprotonierten farbigen Formen vor: Die violette Färbung der Abformmasse resultiert aus der Mischung von rotviolett (Phenolphthalein) und blau (Thymolphthalein).

Durch weitere Vorgänge in dem Dentalabdruckmaterial kommt es in der zweiten und dritten Phase zu einer Absenkung des pH-Wertes. Aus dem Gips in Lösung gehende Ca^{2+} -Kationen reagieren mit den Hydrogenphosphat-Anionen unter Bildung schwerlöslicher $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Niederschläge. Dabei werden Protonen frei, und der pH-Wert sinkt:



Des Weiteren reagiert auch der pH-Modifikator $K_2[TiF_6]$ leicht sauer, da die $[TiF_6]^{2-}$ -Ionen in Wasser langsam hydrolysieren:



In Phase 2 ist der pH-Wert in der Mischung soweit abgesunken, dass nur noch Phenolphthalein in der deprotonierten Form vorliegt. Die Farbe des Dentalabdruckgels ist dann rotviolett. Wenn sich die Abformmasse schließlich weiß verfärbt (Phase 3), sind aufgrund des niedrigeren pH-Wertes sowohl Phenolphthalein als auch Thymolphthalein farblos.

2.6.4.4 Alginat- und alginsäurehaltige Arzneimittel gegen Sodbrennen

Sodbrennen – Symptome, Ursachen und Risikofaktoren

Sodbrennen entsteht durch Rückfluss (med. Reflux) von saurem Mageninhalt in die Speiseröhre (med. Ösophagus). Die Drüsenzellen des Magens sezernieren ein Verdauungsssekret mit einem pH-Wert von etwa 0,9 bis 1,5 – den so genannten Magensaft. Dieser enthält neben Wasser vor allem Salzsäure, eiweißspaltende Enzyme (Pepsin) sowie Schleim (Mucine) und dient in erster Linie der Denaturierung und dem Abbau von Nahrungsproteinen sowie der Desinfektion der Nahrung (Falbe/Regitz 1995 d, S. 2585; Falbe/Regitz 1995 e, S. 4196; Firma Nattermann 2001 a, b, c; Firma Novartis 2000 a).

Als Symptome treten bei Reflux von salzsaurem Magensaft typischerweise brennende Schmerzen in der Speiseröhre und hinter dem Brustbein auf, die bis in den Rücken und Mundbereich ausstrahlen können und an Herzbeschwerden erinnern. Im anglo-amerikanischen Sprachraum wird Sodbrennen daher auch als „heartburn“ bezeichnet. Des Weiteren ist das Aufsteigen von säurehaltigem Mageninhalt in den Ösophagus oft mit Aufstoßen verbunden, das einen sauren oder bitteren Geschmack im Mund hinterlässt (ContinuingEducation.com 2001; Firma Novartis 2000 a; MEDIS 2001 a).

Bei häufiger Reizung durch zurückfließenden Magensaft kann die Schleimhaut der Speiseröhre stark geschädigt werden, da sie im Gegensatz zur Mucosa des Magens nicht über eine vor Säure schützende Schleimschicht verfügt.

Zu den möglichen Spätfolgen von Sodbrennen gehören unter anderem (Falbe/Regitz 1995 e, S. 4196; MEDIS 2001 a, b).

- Entzündungen der Speiseröhrenschleimhaut (med. Refluxösophagitis),
- Geschwüre und Blutungen,
- Verengungen (med. Strikturen) des Ösophagus durch vernarbtes Gewebe,
- Veränderungen in der Speiseröhrenschleimhaut, die Vorstufen von Krebs sein können (med. Barrett-Syndrom).

Beim gesunden Menschen wird das Aufsteigen von saurem Mageninhalt durch einen Schließmuskel an der Mündung der Speiseröhre in den Magen verhindert. Dieser untere Ösophagussphinkter befindet sich im Dauerspannungszustand und öffnet sich normalerweise nur dann, wenn heruntergeschluckte Flüssigkeit oder Nahrung den Reiz dazu geben (Firma Nattermann 2001 d; MEDIS 2001 b).

Bestimmte körperliche Funktionsstörungen können jedoch dazu führen, dass der zuvor beschriebene Verschlussmechanismus versagt. Solche organischen Ursachen für das Auftreten von saurem Reflux sind z. B. (ContinuingEducation.com 2001; Firma Nattermann 2001 e, f; MEDIS 2001 a, b):

- chronische Schwäche des Speiseröhrenschließmuskels,
- Zwerchfellbruch (med. Hiatushernie),
- Druckanstieg im Bauchraum und Senkung der Muskelspannung des Ösophagussphinkters durch hormonelle Einflüsse während einer Schwangerschaft,
- Atemstillstand in der Nacht (med. Schlafapnoe).

Man nimmt allerdings an, dass Sodbrennen auch durch ungesunde Ernährungs- und Lebensgewohnheiten ausgelöst oder zumindest verschlimmert wird. Zu negativen Einflussfaktoren zählen beispielsweise (ContinuingEducation.com 2001; Firma Nattermann 2001 c, e; Firma Novartis 2000 a; MEDIS 2001 a):

- Überladung des Magens mit Speisen,
- Aufnahme zu fetter, süßer, säurehaltiger oder stark gewürzter Nahrungsmittel,
- starkes Übergewicht,
- Hinlegen nach den Mahlzeiten,
- Bewegungsmangel,
- häufige Betätigung der Bauchpresse (z. B. bei Heben, Bücken oder Verstopfung),
- Tragen zu enger Kleidung,
- erhöhter Koffein-, Alkohol- oder Nikotingenuss,
- Einnahme bestimmter Medikamente (z. B. Pille, Schmerzmittel, Antirheumatika oder Antidepressiva)
- psychische Belastungen (Stress etc.).

Therapeutika gegen Sodbrennen

In Deutschland leiden etwa 20 Millionen Menschen unter refluxbedingten Beschwerden. Sie behandeln sich zumeist selbst mit rezeptfreien Medikamenten. Dazu gehören *Antacida*, *alginate- bzw. alginsäurehaltige Therapeutika* sowie *H₂-Rezeptor-Blocker* in niedriger Dosierung. Verschreibungspflichtig sind hingegen sogenannte *Protonenpumpen-Inhibitoren* (Firma Nattermann 2001 g).

(1) Antacida

Bereits seit mehr als 2000 Jahren werden als Arzneimittel für die symptomatische Behandlung von Sodbrennen Antacida eingesetzt (Mandel et al. 2000, S. 671). Darunter versteht man baseliefernde Salze, die den pH-Wert des Magensaftes durch eine Säure-Base-Reaktion (Brønsted) mit der Magensäure auf ein therapeutisches Optimum von $\text{pH} \approx 3 - 5$ erhöhen und dadurch auch die enzymatische Aktivität des Pepsins erniedrigen. Auf diese Weise säurereduzierter Magensaft führt bei Rückfluss in den Ösophagus nicht mehr zu Schleimhautreizungen und -schäden (Firma Nattermann 2001 a, b, g; Kromer/Postius/ Krüger 2001).

Antacida werden üblicherweise nach den Mahlzeiten (med. postprandial) oder vor dem Schlafengehen eingenommen und zeichnen sich durch ein rasches Eintreten der Symptomlinderung aus. Ihre Wirkungsdauer ist mit ein bis drei Stunden jedoch so gering, dass bei stärkeren Beschwerden mehrmalige Einnahme vonnöten sein kann (ContinuingEducation.com 2001; Firma Nattermann 2001 b; MEDIS 2001 a; Mandel et al. 2000, S. 671; Pickett 1985, S. 321). Zwischen den verschiedenen Darreichungsformen von Antacida (Tabletten, Kautabletten und Suspensionen) sind nach neueren Angaben keine wesentlichen Effektivitätsunterschiede feststellbar (Gebler/Kindl 2000, S. 120).

Für die Verwendung als Antacida kommen verschiedene Verbindungen in Frage. Dazu gehören beispielsweise Natriumhydrogencarbonat, Calciumcarbonat sowie baseliefernde Aluminium- und Magnesium-Salze (v. a. Hydroxide und Silicate). Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über deren Wirkprofile gegeben werden (ContinuingEducation.com 2001; Falbe/ Regitz 1995 a, S. 200; Firma Nattermann 2001 a, e; MEDIS 2001 a; Pickett 1985, S. 321; Kromer/Postius/Krüger 2001; Gebler/Kindl 1996 S. 120; Gebler/Kindl 2000, S. 120; Firma Nattermann 2001 h):

Die früher übliche Verabreichung von Natriumhydrogencarbonat gilt inzwischen als überholtes Therapiekonzept. Das Salz verfügt zwar über eine pH-erhöhende Wirkung, aber als unangenehme Begleiterscheinung tritt bei seiner Reaktion mit Magensäure die Bildung von gasförmigem Kohlenstoffdioxid auf. Mögliche Folgen sind z. B. ein Aufblähen des Magens, Aufstoßen und Refluxerscheinungen. Weitere unerwünschte Nebenwirkungen von Natriumhydrogencarbonat lassen sich darauf zurückführen, dass dieses Antacidum resorbierbar ist. Aufgrund dieser Tatsache kann der chronische Gebrauch von NaHCO_3 das Säure-Base-Gleichgewicht des Körpers stören (med. metabolische Alkalose), die Bil-

derung von Nierensteinen begünstigen sowie Bluthochdruck durch Wasserretention verschlimmern.

Wie bei Natriumhydrogencarbonat besteht auch bei Calciumcarbonat das Problem der intragastralen Gasentwicklung. Da etwa 15 % der in CaCO_3 enthaltenen Ca^{2+} -Ionen resorbiert werden, kommt es bei zu häufiger Verabreichung dieses Antacidums zu Störungen des Elektrolythaushaltes und der Nierenfunktion. Von der Einnahme großer Mengen Calciumcarbonat wurde bis vor kurzem noch abgeraten, da dieses Medikament im Verdacht stand, nach Reaktion mit dem salzsauren Magensaft die Säurenachbildung zu verstärken (med. Säure-Rebound). Man führte dies darauf zurück, dass die bei der Säure-Base-Reaktion in Lösung gehenden Ca^{2+} -Ionen die Freisetzung gastrointestinaler Hormone stimulieren, die einen aktivierenden Einfluss auf die Sekretion von Salzsäure haben (Gebler/Kindl 1996, S. 121). Inzwischen wurde aber der Nachweis erbracht, dass es sich bei dem Säure-Rebound-Effekt um ein Artefakt handelt. So zeigten intrakorporale pH-Messungen, die die physiologischen Verhältnisse weniger stören als die bisher angewandten extrakorporalen Methoden, dass CaCO_3 keine verstärkte Nachbildung von Magensäure hervorruft (Gebler/Kindl 2000, S. 120).

Wegen der unerwünschten Nebenwirkungen von NaHCO_3 und CaCO_3 haben sich in der modernen Therapie refluxbedingter Beschwerden vor allem Antacida auf der Basis von Al^{3+} - und Mg^{2+} -Salzen durchgesetzt (ContinuingEducation.com 2001; Falbe/Regitz 1995 a, S. 200; Firma Nattermann 2001 a, b, e, g; Gebler/Kindl 2000, S. 120; Kromer/ Postius/ Krüger 2001; MEDIS 2001 a):

Besonders gebräuchlich sind Kombinationspräparate aus Aluminium- und Magnesiumhydroxiden, aber auch andere baseliefernde Salze der beiden Metall-Kationen, wie z. B. tertiäres Aluminiumphosphat, Magnesiumoxid, Magnesiumsilicat sowie Magnesium-Aluminium-Silicate, spielen eine gewisse Rolle. Aufgrund ihrer Schwerlöslichkeit in Wasser werden Aluminium- und Magnesiumhydroxide nur in geringem Maße vom Organismus aufgenommen. Zwar verursachen absorbierte Al^{3+} -Kationen Verstopfung, aber dieser Effekt kann durch Kombination mit Magnesium-Salzen, die eine abführende Wirkung haben, ausgeglichen werden. Medizinische Untersuchungen konnten zudem belegen, dass die gleichzeitige Verwendung dieser beiden Hydroxide zu einer Wirkungsverstärkung führt (Gebler/Kindl 2000, S. 120). Ein weiterer positiver Effekt $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltiger Antacida besteht in deren Fähigkeit, magentoxische Gallensäuren reversibel zu binden. Außerdem sollen diese Präparate eine zellschützende und mucosaheilende Wirkung haben.

Trotz der Tatsache, dass der Grad der Kationen-Resorption bei schwerlöslichen Aluminium- und Magnesium-Salzen sehr niedrig ist, besteht auch bei diesen Präparaten das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen. Dies ist besonders dann der Fall, wenn die Einnahme in hohen Dosen oder chronisch erfolgt (Gebler/Kindl 1996, S. 122; Gebler/Kindl 2000, S. 121):

Durch zu hohe Al^{3+} -Konzentrationen kann es zur pathologischen Erniedrigung der Phosphat-Konzentration im Blutserum kommen (med. Hypophosphatämie). Weitere gefährliche Folgen sind die Demineralisation und der Abbau der Knochen (med. Osteomalazie und Osteoporose) sowie Gehirnerkrankungen bei Dialysepatienten (med. Enzephalopathie). Mögliche negative Effekte der Gabe großer Mengen magnesiumhaltiger Mittel sind krankhaft erhöhte Mg^{2+} -Konzentrationen im Blut (med. Hypermagnesiämie) sowie begünstigte Nierensteinbildung.

(2) *Alginat- bzw. alginsäurehaltige Therapeutika*

Medikamente auf Alginat- und Alginsäure-Basis werden seit über 30 Jahren für die symptomatische Behandlung von Sodbrennen verwandt und sind z. B. in Großbritannien Marktführer unter den nicht verschreibungspflichtigen Arzneimitteln (Mandel et al. 2000, S. 670). Das Wirkungsprinzip dieser Präparate beruht darauf, dass sie bei Kontakt mit dem salzsauren Magensaft Alginsäure-Gele bilden, die aufgrund ihrer Durchsetzung mit CO_2 -Gasblasen auf dem Mageninhalt aufschwimmen und als pH-neutrale bis schwach saure mechanische Barriere fungieren. Wie verschiedene In-Vitro- und In-Vivo-Studien belegen konnten, treten diese Gele mit schaumartigem Charakter während einer Reflux-Episode entweder als Schutzschicht vor dem sauren Mageninhalt oder sogar an dessen Stelle in die Speiseröhre ein und verhindern so die Reizung der säureempfindlichen Schleimhaut (Mandel et al. 2000, S. 671 – 676).

Im Handel werden zwei verschiedene Darreichungsformen angeboten, flüssige Zubereitungen auf der Basis von Natriumalginat-Lösungen und alginsäurehaltige Tabletten (Mandel et al. 2000, S. 672). Tabelle 26 gibt einen Überblick über die typischen Zusammensetzungen solcher Therapeutika gegen sauren Reflux:

Flüssigpräparate bestehen aus relativ konzentrierten Natriumalginat-Solen, in denen weitere arzneilich wirksame Komponenten und Hilfsstoffe gelöst oder suspendiert vorliegen. Im salzsauren Milieu des Magens werden die hydratisierten Alginat-Polyanionen protoniert. Dabei entstehen ungeladene Alginsäure-Moleküle, die sich über Wasserstoffbrücken-Bindungen zu einem dreidimensionalen Gelnetzwerk assoziieren.

Gleichzeitig reagieren die ebenfalls in den Medikamenten enthaltenen Hydrogencarbonate und Carbonate unter Entwicklung von Kohlenstoffdioxid mit der Magensäure.

Tab. 26: Typische Zusammensetzung alginat- bzw. alginsäurehaltiger Medikamente gegen Sodbrennen am Beispiel zweier auf dem deutschen Markt befindlicher Produkte, die von der Firma Novartis vertrieben werden: „Gaviscon® Advance“ (Einzeldosis: 10 mL) und „Gaviscon® Tabletten“ (Einzeldosis: 2 Tabletten) (Firma ISP 2001 b; Firma Novartis 2000 b, c; verändert).

Alginat- bzw. Alginsäure haltige Mittel gegen Sodbrennen		
Darreichungsform	Inhaltsstoffe	Gehalt in g/Dosis
Flüssigpräparate z. B. „Gaviscon® Advance“, (Vertrieb: Firma Novartis)	Wirksame Bestandteile: <ul style="list-style-type: none"> • Natriumalginat • Kaliumhydrogencarbonat 	1,00 0,20
	Sonstige Bestandteile: <ul style="list-style-type: none"> • Calciumcarbonat • Verdickungsmittel • Konservierungsstoffe • Süßungsmittel • Aromastoffe • Natriumhydroxid • Gereinigtes Wasser 	0,20 } Rest
Tabletten z. B. „Gaviscon® Tabletten“, (Vertrieb: Firma Novartis)	Wirksame Bestandteile: <ul style="list-style-type: none"> • Alginsäure • Natriumhydrogencarbonat • Aluminiumhydroxid 	0,70 0,24 0,20
	Sonstige Bestandteile: <ul style="list-style-type: none"> • Süßungsmittel • Aromastoffe • Weitere Hilfsstoffe 	} Rest

Die resultierenden CO₂-Gasblasen werden in das Alginsäure-Gel eingeschlossen und verleihen ihm Auftrieb. Aufgrund seiner Vergleichbarkeit mit einem Schlauchboot, das auf der Oberfläche eines reißenden Flusses treibt (engl. river-rafting), bezeichnet man dieses schaumartige Gel im Englischen als „alginate raft“ (Firma ISP 2001 b; Firma Novartis 2000 b); Mandel et al., S. 699 ff; Onsøyen 1996, S. 30).

Um zu gewährleisten, dass die mit Kohlenstoffdioxid durchsetzte Alginsäure-Barriere die Speiseröhrenschleimhaut möglichst effektiv vor Säurerückfluss schützt, verwendet man in den Medikamenten extrem niedrigviskose Natriumalginat in hohen Konzentrationen ($\rho^* \approx 30 - 100 \text{ g/L}$). Auf diese Weise wird sichergestellt, dass das bei Kontakt mit Magensäure entstehende Alginsäure-Gel trotz leichter Schluckbarkeit des Arzneimittels genügend Stabilität aufweist (Firma ISP 2001 b; Firma Novartis 2000 b).

Die Funktion des zugesetzten Alkalimetallhydrogencarbonates besteht in erster Linie in der Erzeugung von CO₂-Gasblasen, durch die das Alginsäure-Gel Auftrieb erhält. Das Salz wirkt also nicht primär als pH-erhöhendes Antacidum (Mandel et al. 2000, S. 675).

Enthält das Alginat-Therapeutikum neben einem Alkalimetallhydrogencarbonat auch Calciumcarbonat (vgl. z. B. „Gaviscon® Advance“, Tabelle 8), so tragen die bei der Säure-Base-Reaktion (Brønsted) mit der Magensäure freigesetzten Calcium-Kationen zusätzlich zur Festigkeit der Schutzschicht bei. Dies beruht darauf, dass Polyguluronat-Sequenzen unter Einlagerung von Ca²⁺-Ionen Calciumalginat-Gele zu bilden vermögen (Mandel et al. 2000, S. 672; Onsøyen 1996, S. 30).

Die chemischen und physikalischen Vorgänge, auf denen die Wirkungsweise alginathaltiger Medikamente gegen Sodbrennen basiert, werden in Abbildung 54 nochmals schematisch zusammengefasst.

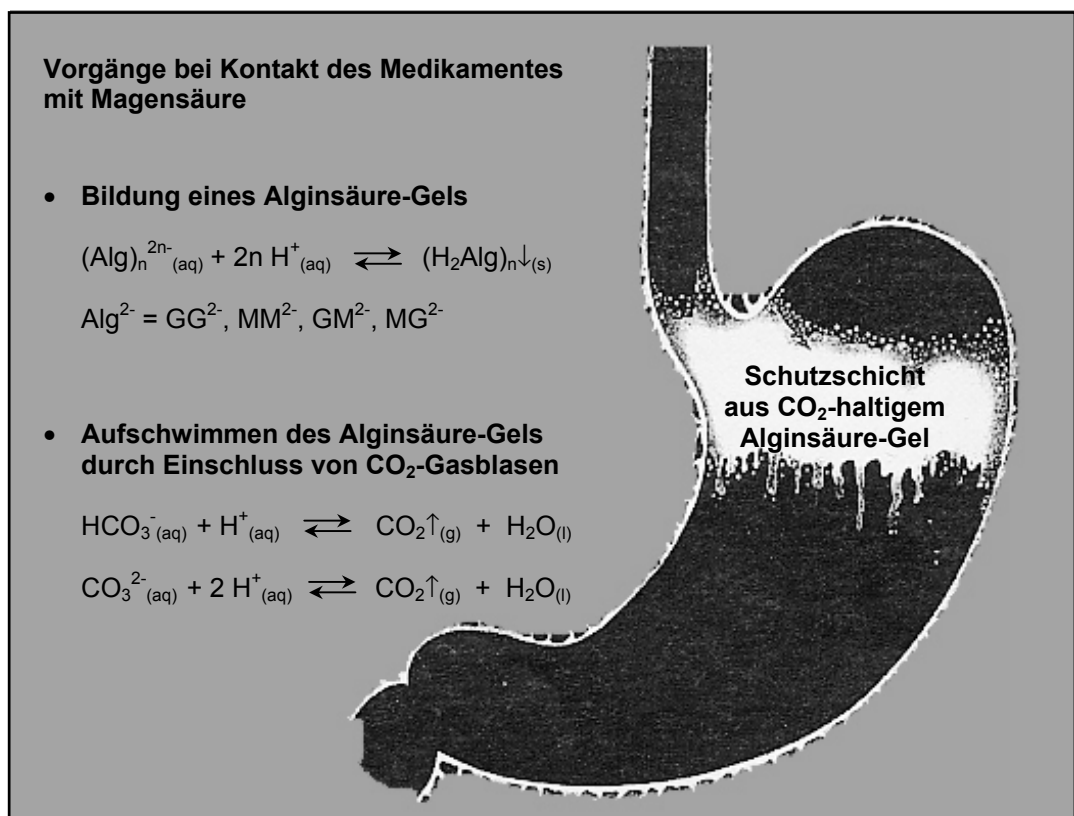


Abb. 54: Wirkungsmechanismus alginathaltiger Medikamente gegen Sodbrennen (aus Onsøyen 1996, S. 30; verändert).

Neben alginathaltigen flüssigen Zubereitungen werden auch Tabletten auf Alginsäure-Basis für die Behandlung von Sodbrennen angeboten. Wie aus Tabelle 26 ersichtlich ist, enthalten diese als wirksame Hauptbestandteile typischerweise wasserunlösliche Alginsäure und ein Alkalimetallhydrogencarbonat (z. B. NaHCO₃).

Wenn die Tabletten leicht zerkaut mit etwas Flüssigkeit eingenommen werden, kommt die Alginsäure in Kontakt mit Speichel bzw. Wasser und reagiert dann unter CO_2 -Entwicklung mit den in Lösung gehenden Hydrogencarbonat-Anionen.

So entsteht ein viskoses, mit Gasblasen durchsetztes Natriumalginat-Sol, das durch den Ösophagus in den Magen gelangt. Wie bei den Flüssigpräparaten bildet sich anschließend im salzsauren Milieu des Magens ein schaumartiges Alginsäure-Gel, das durch eingeschlossenes Kohlenstoffdioxid auf dem Nahrungsbrei aufschwimmt. Verwendete man in den Tabletten statt wasserunlöslicher Alginsäure direkt Natriumalginat, käme es im Mund zu Klumpenbildung (Firma ISP 2001 b; Firma Novartis 2000 c).

Um synergistische Wirkungen zu erzielen, setzt man Tabletten gegen Sodbrennen neben Alginsäure und Hydrogencarbonat noch zusätzlich Antacida, wie z. B. Aluminiumhydroxid, zu (vgl. Tabelle 26). Dieses in Wasser schwer lösliche Hydroxid wird zunächst in die Alginsäure-Barriere eingeschlossen und reagiert dann sukzessive mit der Magensäure, wodurch letztendlich eine intragastrale pH-Erhöhung bewirkt wird (Firma ISP 2001 b).

Die Ergebnisse verschiedener Studien legen jedoch nahe, dass die Wirksamkeit alginat- bzw. alginsäurehaltiger Reflux-Therapeutika unabhängig von dem pH-Wert ist, den der Mageninhalt unter der schaumigen Alginsäure-Barriere hat. Vielmehr scheinen die mechanischen Eigenschaften des entstehenden Gel-Schaums entscheidend für die Effektivität dieser Medikamente zu sein (Mandel et al. 2000, S. 675, 681).

Alginat- bzw. alginsäurehaltige Therapeutika zeichnen sich besonders dadurch aus, dass sie genauso schnell wirken wie traditionelle Antacida, aber über einen viel längeren Zeitraum das Auftreten von Beschwerden unterbinden (Mandel et al. 2000, S. 683). Wie eine Vergleichsstudie zwischen einer flüssigen Alginat-Zubereitung und einem $\text{Al}(\text{OH})_3$ - $\text{Mg}(\text{OH})_2$ -Antacidum ergab, zeigte das alginathaltige Therapeutikum sogar deutliche Überlegenheit bezüglich des Einsetzens und der Dauer der Symptomlinderung (Mandel et al. 2000, S. 681).

Trotz der im Vorangehenden genannten Vorzüge alginat- bzw. alginsäurehaltiger Mittel gegen Sodbrennen können mit der Verabreichung dieser Medikamente auch eine Reihe von Problemen verbunden sein:

Eine entscheidende Voraussetzung für die optimale Wirksamkeit der Therapeutika auf Algenpolysaccharid-Basis besteht darin, dass deren Einnahme nach den Mahlzeiten erfolgt. Ansonsten vermischt sich das Medikament mit dem entweder gleichzeitig oder nachträglich heruntergeschluckten Nahrungsbrei, und die Ausbildung einer schützenden Alginsäure-Gelschicht unterbleibt (Mandel et al. 2000, S. 676, 683).

Des Weiteren können alginat- bzw. alginsäurehaltige Medikamente nur eingeschränkt Schutz vor in der Nacht auftretenden Reflux-Beschwerden bieten. Dies liegt darin begründet, dass die von diesen Präparaten erzeugten Alginsäure-Barrieren nur bei aufrechter Körperhaltung effektiv die Schädigung der Ösophagusschleimhaut durch aufsteigende

Magensäure verhindern. In einer Untersuchung mit Reflux-Patienten, die im Liegen mit Gaviscon[®]-Tabletten behandelt wurden, war die hervorgerufene Symptomlinderung z. B. nicht stärker ausgeprägt als bei der Kontrollgruppe, der man ein herkömmliches Antacidum verabreichte (Mandel et al. 2000, S. 682 f., 687).

(3) *H₂-Rezeptor-Blocker und Protonenpumpen-Inhibitoren*

Bei schweren Fällen von Refluxösophagitis werden neben Antacida und alginat- bzw. alginat-säurehaltigen Mitteln auch Medikamente eingesetzt, die die Sekretion von Magensäure für einen therapeutisch wirksamen Zeitraum stark einschränken. Dazu gehören so genannte H₂-Rezeptor-Blocker und Protonenpumpen-Inhibitoren, die sich folgendermaßen in ihren Wirkungsmechanismen unterscheiden:

Die Freisetzung von Salzsäure ins Mageninnere wird durch die gemeinsame Wirkung der Hormone Gastrin und Histamin angeregt. Diese beiden Substanzen binden jeweils an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran der Belegzellen des Magens. Die Säurefreisetzung kann nur dann stattfinden, wenn beide Rezeptoren gleichzeitig belegt sind. H₂-Rezeptor-Blocker (Wirkstoffe, wie z. B. Cimetidin, Famotidin, Ranitidin und Nizatidin) sind strukturelle Analoga von Histamin, die Histamin-Rezeptoren des Typs H₂ blockieren und dadurch die Sekretion von Magensäure hemmen (ContinuingEducation.com 2001; Kromer/Postius/Krüger 2001; Randall et al. 2000, S. 753 f.). Für die kurzfristige, symptomatische Behandlung von Sodbrennen sind neuerdings niedrig dosierte Ranitidin- und Famotidin-Präparate rezeptfrei erhältlich (Gebler/Kindl 2000, S. 120).

Der Verschreibungspflicht unterliegen hingegen sogenannte Protonenpumpen-Inhibitoren (Wirkstoffe, wie z. B. Omeprazol, Lansoprazol, Pantoprazol). Diese Therapeutika hemmen ein Enzym in der Membran der Belegzellen, das die Sekretion von Salzsäure steuert. Es handelt sich dabei um die K⁺-H⁺-ATPase, die als Protonenpumpe fungiert, indem sie Protonen im Austausch für K⁺-Ionen in den Magen transportiert. Die dafür erforderliche Energie wird durch die gleichzeitige Hydrolyse von ATP gewonnen (ContinuingEducation.com 2001; Deetjen/Speckmann 1994, S. 420 f.; Falbe/Regitz 1997; Kromer/Postius/Krüger 2001).

H₂-Rezeptor-Blocker und Protonenpumpen-Inhibitoren zeichnen sich gegenüber den bereits erwähnten Medikamenten gegen sauren Reflux besonders durch ihre lange Wirkungsdauer aus. So sind z. B. H₂-Rezeptor-Blocker in der Lage, für mindestens sechs Stunden einen erhöhten pH-Wert im Magen aufrechtzuerhalten (Firma Nattermann 2001 h; Mandel et al. 2000, S. 671). Da die beiden Therapeutika jedoch zunächst absorbiert werden müssen, bevor sich ihre Wirkung entfaltet, tritt Symptomlinderung erst später ein als bei Antacida und alginat- bzw. alginat-säurehaltigen Mitteln (Mandel et al. 2000, S. 671). Ein zusätzlicher Nachteil von H₂-Rezeptor-Blockern und Protonenpumpen-Inhibitoren wird darin gesehen, dass sie den pH im Magen relativ stark anheben. Mit H₂-Rezeptor-Blockern erreicht man z. B. Werte um pH = 6 (Firma Nattermann 2001 b). Eine potentielle

Folge besteht darin, dass die Eiweißverdauung durch Pepsin, die nur im sauren Milieu vonstatten geht, gestört wird. Außerdem erleichtert eine fehlende Säurebarriere im Magen den Befall des Verdauungstraktes mit schädlichen Bakterien (Firma Nattermann 2001 a, b).

Experimentelle Veranschaulichung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden zwei Versuche erarbeitet, mit denen sich die Wirkungsweise alginat- bzw. alginsäurehaltiger Arzneimittel gegen Sodbrennen möglichst einfach, aber anschaulich verdeutlichen lässt.

Experiment 28 ermöglicht es den Schülern, anhand eines Modellsystems das Funktionsprinzip eines alginathaltigen Medikamentes gegen Sodbrennen zu untersuchen. Aus einer Mischung von Natriumalginat-Sol, Kaliumhydrogencarbonat und Calciumcarbonat wird zunächst ein Reflux-Therapeutikum hergestellt. Gibt man dieses nun zu verdünnter Salzsäure, deren pH-Wert ungefähr dem des Magensaftes entspricht, so ist schon nach kurzer Zeit die Bildung eines auf der Flüssigkeit aufschwimmenden Alginsäure-Gel-Schaums zu beobachten.

Die Massenkonzentration der im Versuch verwendeten Algenpolysaccharid-Lösung liegt mit $\rho^* = 20$ g/L deutlich niedriger als in handelsüblichen Medikamenten. Dies liegt darin begründet, dass anstelle eines niedrigviskosen Spezialproduktes Natriumalginat der Standardqualität eingesetzt wird, da dieses für schulische Zwecke leichter zu beschaffen ist. Wenn die Konzentrationsverhältnisse des Originalmedikaments möglichst authentisch nachgestellt werden sollen, führt man Experiment 28 idealerweise mit einer wässrigen Lösung von „Protanal LFR 5/50“ ($\rho^* = 100$ g/L) (Firma FMC Biopolymer; Vertrieb: Firma Interorgana) durch.

Experiment 29 hat das Ziel, das Funktionsprinzip eines alginathaltigen Reflux-Therapeutikums zu verdeutlichen. In einem Modellversuch wird hier die Reaktion einer käuflichen Alginsäure-Tablette mit Salzsäure ($\text{pH} = 1$) beobachtet.

Bei der experimentellen Umsetzung wurde aus zwei Gründen ein Verzicht auf die Eigenherstellung des Arzneimittels verzichtet: Die zu diesem Zweck notwendige Darstellung des Inhaltsstoffes $\text{Al}(\text{OH})_3$ sowie das Pressen der Tabletten sind für den Chemieunterricht zu aufwändig. Des Weiteren lassen sich Medikamente auf Alginsäure-Basis (z. B. „Gaviscon® Tabletten“, Firma Novartis) rezeptfrei und zu akzeptablen Preisen in der Apotheke beschaffen.

2.6.4.5 Dekorporierung von radioaktivem Strontium

Ionenaustauscheigenschaften von Alginaten

Im Vorangehenden wurden Einsatzmöglichkeiten der Alginat diskutierte, die im Wesentlichen deren Fähigkeit ausnutzen, mit Calcium-Ionen wasserunlösliche Gele zu bilden. Alginat sind aber nicht nur in der Lage, diese Erdalkalimetall-Kationen zu binden. Vielmehr konnte durch Untersuchungen zu den Ionenaustauschereigenschaften der Algenpolysaccharide gezeigt werden, dass sie sogar noch höhere Affinitäten zu anderen zweifach positiv geladenen Metall-Ionen aufweisen. Für guluronatreiches Alginat aus der Braunalge *Laminaria hyperborea* wurde folgende Selektivitätsreihe ermittelt (Haug 1961, S. 1795):



Abb. 55: Ionenaustauschereigenschaften von Alginaten: Abnehmende Bindungsfähigkeit für zweiwertige Metall-Kationen (Haug/Smidsrød 1965, S. 342).

In-vivo-Austausch von ^{90}Sr

Wie aus Abbildung 55 hervorgeht, verfügen Alginat *in vitro* über eine größere Bindungsfähigkeit für Strontium- als für Calcium-Ionen. Diese Erkenntnis stellte den Ausgangspunkt für Studien dar, in denen die Verwendbarkeit dieser Algenpolysaccharide als *In-vivo*-Ionenaustauscher bei hoher ^{90}Sr -Belastung untersucht wurde.

^{90}Sr ist ein bei Reaktorstörfällen oder Kernwaffenexplosionen frei werdender β -Strahler, dessen Halbwertszeit etwa 29 Jahre beträgt. Die Gefährlichkeit dieses Isotops beruht vor allem darauf, dass es sich in chemischer Hinsicht im Organismus ähnlich wie Calcium verhält: Gelangen $^{90}\text{Sr}^{2+}$ -Ionen über die Nahrung in den menschlichen Körper, so werden sie in Zähne und Knochen eingebaut. Die überhöhte Aufnahme radioaktiven Strontiums kann zur Bildung von Knochensarkomen führen (Tanaka/Stara 1979, S. 528).

Alginat zeichnet sich nun durch die besondere Eigenschaft aus, die Resorption von $^{90}\text{Sr}^{2+}$ -Ionen zu hemmen, ohne dabei einen schädlichen Einfluss auf die Calcium-Aufnahme des Organismus' auszuüben (Steinegger/Hänsel 1992, S. 138). In Tierversuchsstudien konnte 1964 erstmals gezeigt werden, dass sich das Algenpolysaccharid *in vivo* erfolgreich einsetzen lässt, um die Inkorporierung von radioaktivem Strontium zu verringern (Skoryna/Paul/Waldron-Edward 1964; zitiert in Tanaka/Stara 1979, S. 529). Dieses Ergebnis wurde in Tests mit freiwilligen menschlichen Probanden bestätigt (Sutton 1967, Hodgkinson et al. 1967; zitiert in Tanaka/Stara 1979, S. 529). In Versuchsreihen mit Katzen erwies es sich sogar als möglich, durch Zusatz von Natriumalginat zum Futter das bereits in

der Knochensubstanz der Tiere eingebaute Radionuklid wieder zu dekorporieren (Stara 1969; zitiert in Tanaka/Stara 1979).

Die zuvor beschriebenen Befunde legen nahe, dass Alginat in Fällen erhöhter ^{90}Sr -Kontamination sowohl für Präventions- als auch für Therapiezwecke wirksam als *In-vivo*-Ionenaustauscher einsetzbar ist (Tanaka et al., S. 603):

Die präventive Wirkung von oral appliziertem Calciumalginat beruht darauf, dass es mit der Nahrung in den Darm gelangendes $^{90}\text{Sr}^{2+}$ unter Abgabe von Calcium-Ionen so effektiv bindet, dass nur noch minimale Mengen des Radioisotops über das Blut in die Knochensubstanz gelangen. Das bei der Ionenaustauschreaktion entstehende Strontiumalginat ist unlöslich und unverdaulich. Es wird daher ausgeschieden, ohne signifikante Schädigungen des Organismus hervorzurufen.

In therapeutischer Hinsicht ist Calciumalginat dahingehend von Bedeutung, dass es die Dekorporierung von radioaktivem Strontium herbeiführen kann, dessen Einlagerung in den Knochen bereits erfolgt ist. In diesem Falle wird das gebundene $^{90}\text{Sr}^{2+}$ langsam ins Blut freigesetzt, gelangt durch Resekretion in den Darm und wird dann, wie zuvor beschrieben, in Form von unlöslichem Strontiumalginat ausgeschieden (Tanaka/Stara 1979, S. 529). Abbildung 56 fasst die mit der *In-vivo*-Bindung von radioaktivem Strontium verbundenen Prozesse schematisch zusammen.

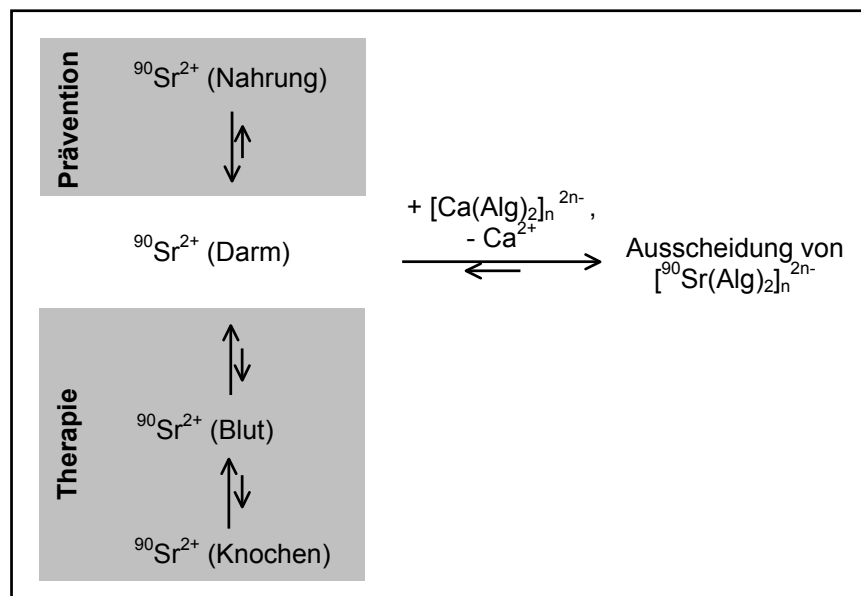


Abb. 56: *In-vivo*-Bindung von radioaktivem Strontium durch Calciumalginat (Tanaka/Stara 1979, S. 529; Tanaka et al. 1972, S. 603; verändert).

Experimentelle Veranschaulichung

In Experiment 30 soll auf der Basis einer *In-vitro*-Ionenaustauschreaktion demonstriert werden, dass Alginat eine höhere Affinität zu Strontium- als zu Calcium-Ionen besitzt. Dafür wurde ein Versuch entwickelt, der belegt, dass die in Calciumalginat-Gel gebundenen Ca^{2+} -Ionen bei Einwirkung einer wässrigen Lösung von nicht radioaktivem Strontiumchlorid partiell durch Sr^{2+} verdrängt werden. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Isotope eines Elementes zwar in ihren physikalischen, nicht jedoch in ihren chemischen Eigenschaften unterscheiden, kann mit Hilfe dieses Experiments modellhaft die Einsetzbarkeit von Calciumalginat als *In-vivo*-Austauscher für $^{90}\text{Sr}^{2+}$ veranschaulicht werden. In dem Modellversuch verwendet man als Ionenaustauschmaterial Calciumalginat-Perlen, deren Herstellung durch Eintropfen von Natriumalginat-Sol in Calciumchlorid-Lösung erfolgt. Die ausgehärteten Gel-Kugeln werden in entionisiertem Wasser suspendiert, in eine Säule gefüllt und so lange gewaschen, bis im Durchlauf mit Ammoniumoxalat-Lösung keine Ca^{2+} -Ionen mehr nachweisbar sind.

Tropft man auf die derart vorbereitete Säule ein auf die Kapazität des Ionenaustauschermaterials abgestimmtes Volumen einer Strontiumchlorid-Lösung ($c = 0,04 \text{ mol/L}$) auf, so wird ein Teil der in den Calciumalginat-Kugeln gebundenen Ca^{2+} -Ionen durch Sr^{2+} ersetzt³. Das damit verbundene Austauschgleichgewicht wird in Abbildung 57 a) beschrieben:

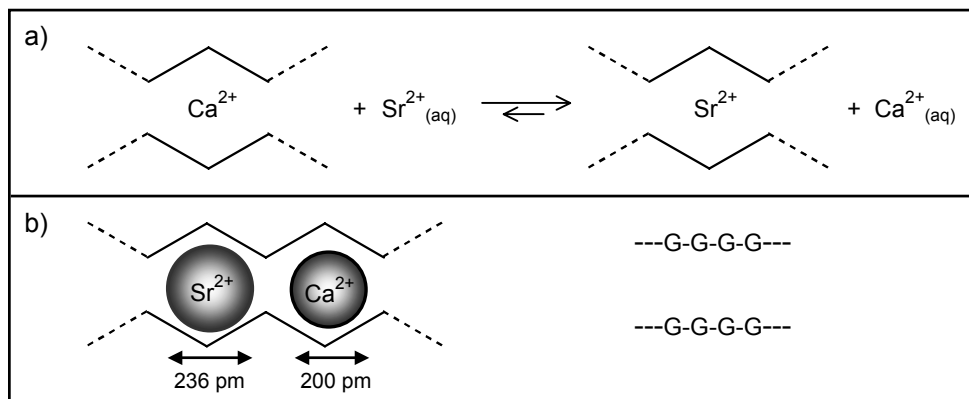


Abb. 57: Schematische Darstellung der Vorgänge, die dem Modellversuch zum *In-vivo*-Austausch von radioaktivem Strontium zugrunde liegen: a) Ionenaustauschgleichgewicht, b) Verdeutlichung der Größenverhältnisse bei der Bindung von Strontium- und Calcium-Ionen in einer Polyguluronat-Sequenz (Angaben zu Durchmessern der nicht hydratisierten Kationen aus Mortimer 1996, S. 489).

³ Wie komplexometrische Titrations ergaben, erfolgt unter den angegebenen Bedingungen der Austausch von Ca^{2+} durch Sr^{2+} nahezu quantitativ: Die jeweils im Eluat gefundene Stoffmenge an freigesetzten Calcium-Ionen lag zwischen 97 und 99 % des theoretisch zu erwartenden Wertes.

Die Tatsache, dass Alginat über eine höhere Affinität zu Sr^{2+} als zu Ca^{2+} verfügt, lässt sich mit der unterschiedlichen Größe der beiden Erdalkalimetall-Kationen erklären ($d(\text{Sr}^{2+}) = 236 \text{ pm}$, $d(\text{Ca}^{2+}) = 200 \text{ pm}$): Wegen ihres größeren Durchmessers im nicht hydratisierten Zustand können Strontium-Ionen offensichtlich besser mit den Sauerstoff-Atomen in den Hohlräumen guluronatreicher Alginat-Sequenzen interagieren und werden daher bevorzugt eingelagert. Dahingegen wird die Chelatisierung der kleineren Calcium-Ionen vermutlich dadurch erschwert, dass hier aufgrund der größeren räumlichen Distanz die Wechselwirkungen zwischen dem Metall-Kation und den als Liganden fungierenden Sauerstoff-Atomen nicht so stark sind.

Abbildung 57 verdeutlicht schematisch die beschriebenen Bindungsverhältnisse. Zur Veranschaulichung dient auch Modell 2 (vgl. Experimenteller Teil): Hier wird mit Hilfe eines Eierkartons und zwei unterschiedlich großen Pappmaché- bzw. Styroporkugeln, die Ca^{2+} - und Sr^{2+} -Ionen symbolisieren, ein vereinfachtes Koordinationsmodell für die Bindung der Erdalkalimetall-Kationen durch Polyguluronat-Sequenzen angefertigt.

Da bei der Ionenaustauschreaktion die in den Calciumalginat-Gelkugeln gebundenen Calcium- durch Strontium-Ionen ersetzt werden, sollte man im Eluat Ca^{2+} , aber kein Sr^{2+} vorfinden. Bevor jedoch das alleinige Vorliegen von Calcium-Ionen mittels Ammoniumoxalat eindeutig nachweisbar ist, muss zunächst im Eluat die Anwesenheit von Sr^{2+} ausgeschlossen werden, da beide Kationen mit Oxalat schwerlösliche weiße Niederschläge bilden.

Als Testreaktion auf Strontium-Ionen wird eine Tüpfelprobe mit Natriumrhodizonat-Lösung auf Filterpapier durchgeführt: Läge im Eluat Sr^{2+} vor, so würde man hier die Bildung eines roten Niederschlages beobachten.

Um zu zeigen, dass Strontium-Ionen mit Hilfe der genannten Methode unter den im Eluat vorherrschenden Konzentrationsverhältnissen nachweisbar wären („Blindprobe“), wenn nicht ihre Bindung in der Säule erfolgte, wird die

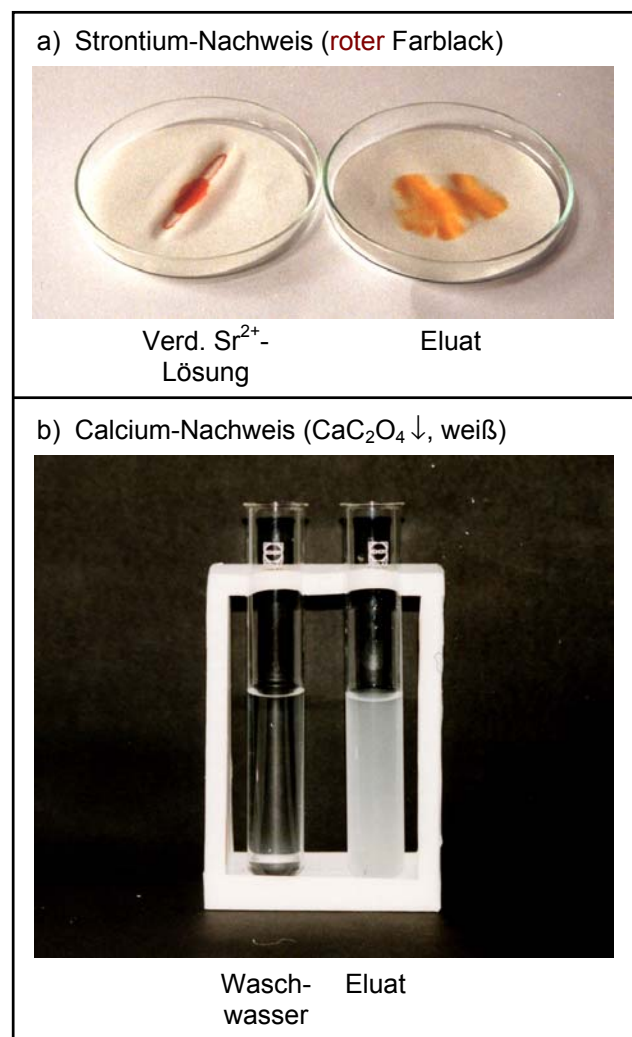


Abb. 58: Ergebnisse der Nachweise für die an der Ionenaustauschreaktion beteiligten Erdalkalimetall-Kationen (Experiment 30).

Tüpfelreaktion auch mit einer auf das Eluat-Volumen verdünnten 25-mL-Probe der $\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,04 \text{ mol/L}$) durchgeführt. Hier beobachtet man einen positiven Verlauf des Strontium-Nachweises (vgl. Abbildung 58 a)).

Nach Prüfung auf Abwesenheit von Sr^{2+} lassen sich die im Eluat vorhandenen Calcium-Ionen durch Ausfällung von Calciumoxalat eindeutig nachweisen (vgl. Abbildung 58 b)). Da die mit Calciumalginat-Gelkugeln gefüllte Säule vor Auftropfen der Sr^{2+} -Lösung mit entionisiertem Wasser Ca^{2+} -frei gewaschen wurde, steht zudem fest, dass die gefundenen Calcium-Ionen erst bei der Kationenaustauschreaktion freigesetzt worden sein können und nicht etwa an den Kugeln anhaftende Reste von CaCl_2 -Lösung darstellen.

2.6.5 Potentielle neue Einsatzzwecke

2.6.5.1 Quantitative Bestimmung von Erdalkalimetall-Kationen mit Alginsäure-Kationenaustauschern

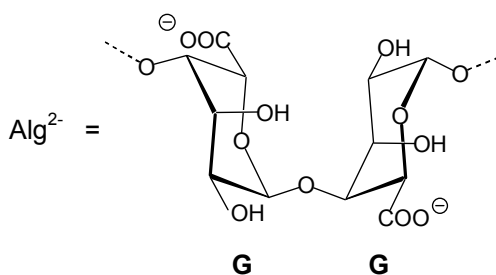
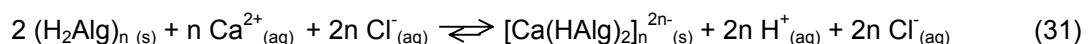
Entwicklung der Methode

Im Vorangehenden wurde bereits mehrfach thematisiert, dass Alginate und Alginsäure über die Fähigkeit verfügen, Kationen auszutauschen (vgl. Theoretischer Teil, Kapitel 2.4, 2.6.2 und 2.6.4).

Ausgehend von dieser charakteristischen Eigenschaft der Algenpolysaccharide soll hier untersucht werden, ob Alginsäure im Säulenbetrieb als Kationenaustauscher für quantitative Bestimmungen von Erdalkalimetall-Kationen ($M^{2+} = Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}$) einsetzbar ist. Zunächst werden Versuchsreihen mit Alginsäure-Gelkugeln durchgeführt, die sich durch Eintropfen von Natriumalginat-Lösung in verdünnte Salzsäure unter Einsatz einer Spritze herstellen lassen (zur Vorgehensweise vgl. Experiment 31).

Die Alginsäure-Kugeln werden in eine Säule gefüllt und so lange mit entionisiertem Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Eluats etwa 6 beträgt⁴.

Auf die so vorbereitete Ionenaustauschersäule bringt man nun mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von etwa einem Tropfen pro Sekunde ein definiertes Volumen einer Calciumchlorid-Lösung mit bekanntem Ca^{2+} -Gehalt auf. Hierbei wird die vorhandene Alginsäure partiell zu Calciumalginat umgesetzt:

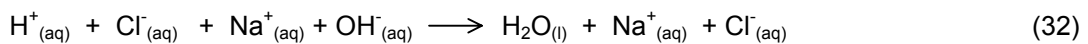


Da die Bindung von Calcium-Ionen gemäß dem in Teil B, Kapitel 2.3.2 diskutierten „Egg Box-Model“ bevorzugt durch GG-Sequenzen erfolgt, kommt bei den Versuchen ein Natriumalginat mit hohem Guluronat-Anteil ($w(GG) = 0,55 - 0,60$) zum Einsatz.

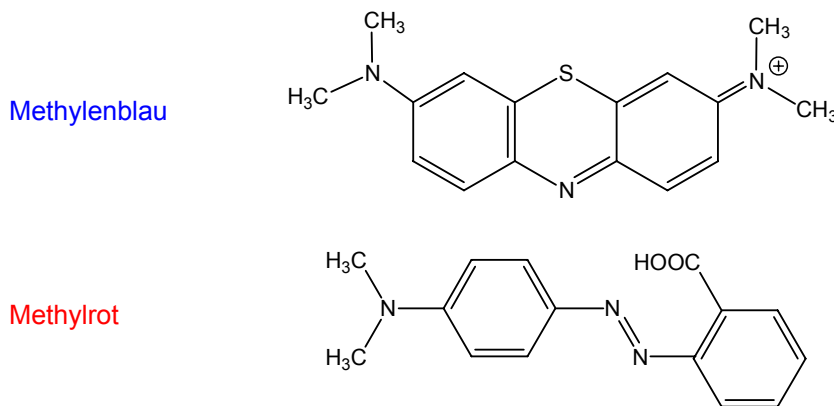
⁴ Dies entspricht dem pH-Wert des zum Spülen verwendeten entionisierten Wassers, der durch Reaktion mit dem Kohlenstoffdioxid der Luft um eine Einheit unterhalb des Neutralpunktes liegt.

Die bei dem Ionenaustauschprozess freigesetzte Salzsäure wird mit entionisiertem Wasser eluiert und quantitativ in einem Erlenmeyerkolben aufgefangen. Dieser Vorgang muss so lange durchgeführt werden, bis der pH-Wert des Säulendurchlaufes wiederum bei 6 liegt.

Durch Titration mit Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$, t) gegen einen Mischindikator aus Methylblau und Methylrot lässt sich die Stoffmenge der im Eluat vorliegenden Protonen gemäß Gleichung (32) quantitativ bestimmen. Der Endpunkt der Reaktion wird durch einen Farbumschlag des Indikators von rotviolett nach grün angezeigt.



Mischindikator (Umschlagsbereich: $\text{pH} = 4,2 - 6,2$):



Nach dem von Grant et al. (1973, S. 197) entwickelten Koordinationsmodell wird ein Calcium-Ion jeweils durch vier Guluronat-Reste chelatisiert. Als Liganden sind dabei zwei Carboxylat-Gruppen aus gegenüberliegenden Algenpolysaccharid-Sequenzen beteiligt (vgl. Theoretischer Teil, Kapitel 2.3.2). Wenn der in Gleichung (31) diskutierte Ionenaustauschprozess quantitativ erfolgt, kann man also davon ausgehen, dass für jedes gebundene Calcium-Ion zwei Protonen freigesetzt werden.

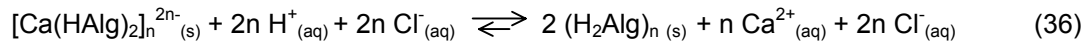
Aus dem bei der Titration verbrauchten Volumen an Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$, t) lässt sich somit folgendermaßen auf den Calcium-Gehalt der aufgebrauchten Probe schließen:

$$n(\text{H}^+_{(\text{aq})}) = \frac{c(\text{NaOH}_{(\text{aq})}) \cdot t(\text{NaOH}_{(\text{aq})})}{V(\text{NaOH}_{(\text{aq})})} \quad (33)$$

$$n(\text{Ca}^{2+}_{\text{praktisch}}) = 0,5 \cdot n(\text{H}^+_{(\text{aq})}) \quad (34)$$

$$m(\text{Ca}^{2+}_{\text{praktisch}}) = n(\text{Ca}^{2+}_{\text{praktisch}}) \cdot M(\text{Ca}) = n(\text{Ca}^{2+}_{\text{praktisch}}) \cdot 40,078 \text{ g/mol} \quad (35)$$

Damit man die Ionenaustauschersäule mehrfach einsetzen kann, muss überprüft werden, ob sich die gebundenen Calcium-Ionen durch Aufbringen eines Überschusses an Salzsäure wieder entfernen lassen. Diesem Regenerationsvorgang liegt die in Gleichung (36) dargestellte Reaktion zugrunde.



Die Ergebnisse von ersten Versuchen zur Calcium-Bestimmung mit Alginsäure-Gelkugeln werden in Tabelle 27 zusammengefasst:

Wie ersichtlich, reichen die Alginsäure-Überschüsse in den drei Säulen nicht aus, um die aufgebrachten Calcium-Ionen vollständig zu binden. In Säule 2 und 3 wird dies durch Testreaktionen auf Ca^{2+} und Cl^- überprüft. In beiden Eluatlen lassen sich durch Ausfällung von Calciumoxalat bzw. Silberchlorid die betreffenden Ionen nachweisen.

Vergleicht man jedoch jeweils die in Zeile 9 angegebenen H_2GG -Überschüsse mit den in Zeile 10 aufgeführten Prozentwerten für die Wiederfindung der auf die Säule gegebenen Ca^{2+} -Stoffmengen, so wird deutlich, dass durch die Erhöhung der Säulenkapazität die Versuchsergebnisse entscheidend verbessert werden können: Während man bei stöchiometrischen Ca^{2+} -GG-Verhältnis im Eluat nur 46,8 % der eingesetzten Calcium-Ionen durch Titration wiederfindet (Säule 1), erzielt man durch Steigerung der H_2GG -Menge auf einen 4,6-fachen Überschuss (Säule 3) ein deutlich besseres Ergebnis.

Tab. 27: Ergebnisse der Calcium-Bestimmungen mit Alginsäure-Gelkugeln im Säulenbetrieb.

	Säule 1: Große Alginsäure-Gelkugeln	Säule 2: Große Alginsäure-Gelkugeln	Säule 3: Kleine Alginsäure-Gelkugeln
Herstellungsbedingungen Natriumalginat-Sol	200 mL ($\rho^* = 15 \text{ g/L}$, $w(\text{GG}) = 0,60$)	200 mL ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$, $w(\text{GG}) = 0,58$)	400 mL ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$, $w(\text{GG}) = 0,58$)
Salzsäure	400 mL ($c = 0,1 \text{ mol/L}$)	400 mL ($c = 0,1 \text{ mol/L}$)	600 mL ($c = 1 \text{ mol/L}$)
Eintropfvorrichtung	Spritze mit Auslauf- durchmesser von $d = 1,5 \text{ mm}$	Spritze mit Auslauf- durchmesser von $d = 1,5 \text{ mm}$	Spritze mit Kanüle ($d = 0,45 \text{ mm}$)
Eingesetzte CaCl_2-Lösung			
Massengehalt			
$\rho^* (\text{Ca}^{2+}_{\text{theoretisch}}) / \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	2,745	2,745	2,629
Probengröße			
V/mL	25	20	15
Stoffmenge in der Probe			
$n (\text{Ca}^{2+}_{\text{theoretisch}}) / \text{mol}$	0,00171	0,00137	0,00098
Alginsäure in der Säule			
Stoffmenge (bezogen auf GG-Sequenzen)			
$n (\text{H}_2\text{GG}_{\text{Säule}}) / \text{mol}$	0,00342	0,00582	0,00916
Theoretisch bindbare Ca^{2+}-Stoffmenge			
$n (\text{Ca}^{2+}_{\text{bindbar}}) / \text{mol}$	0,00171	0,00291	0,00458
H_2GG-Überschuss (bezogen auf $n (\text{Ca}^{2+}_{\text{theoretisch}})$ in der Probe)^a	Stöchiometrisches Verhältnis	2,1-fach	4,7-fach
Eluat			
Endvolumen			
V (Eluat)/mL	≈ 500	≈ 500	≈ 600
Durch Titration ermittelte Stoffmenge an Ca^{2+}-Ionen			
$n (\text{Ca}^{2+}_{\text{praktisch}}) / \text{mol}$	0,00080	0,00088	0,00085
Wiederfindung			
$\frac{n (\text{Ca}^{2+}_{\text{praktisch}}) \cdot 100 \%}{n (\text{Ca}^{2+}_{\text{theoretisch}})}$	46,8 %	64,2 %	86,7 %
Nachweisreaktionen			
Ca^{2+} (als $\text{CaC}_2\text{O}_4 (\text{s})$)	Nicht durchgeführt	+	+
Cl^- (als $\text{AgCl} (\text{s})$)	Nicht durchgeführt	+	+

^a Zur Berechnung vgl. S. 150.

Der jeweils in Zeile 9 der Tabelle aufgeführte H₂GG-Überschuss berechnet sich wie folgt: Die Alginsäure-Säulenfüllungen werden mit unterschiedlichen Ausgangsmengen an Natriumalginat hergestellt, dessen GG-Gehalt etwa $w = 0,55 - 0,6$ beträgt.

Da jeweils nur ein Teil der durch Eintropfen von Natriumalginat-Sol in verdünnte Salzsäure angefertigten Alginsäure-Gelkugeln in die Säule eingefüllt wird, bestimmt man durch Wägung jeweils die Masse des gesamten Ansatzes und zieht von diesem Wert die Masse der abgetrennten Kugeln ab. Auf diese Weise ergibt sich die in der Säule vorliegende Alginsäure-Menge:

$$m(\text{Alginsäure}_{\text{Säule}}) = m(\text{Alginsäure}_{\text{gesamt}}) - m(\text{Alginsäure}_{\text{abgetrennt}}) \quad (37)$$

Unter Berücksichtigung der Natriumalginat-Ausgangsportion und deren GG-Anteil lässt sich dann die Masse an Na₂GG berechnen, die tatsächlich in Form von H₂GG in der Säule vorliegt.

$$m(\text{Na}_2\text{GG}_{\text{tatsächlich}}) = m(\text{Natriumalginat}_{\text{eingesetzt}}) \cdot w(\text{GG}) \cdot \frac{m(\text{Alginsäure}_{\text{Säule}})}{m(\text{Alginsäure}_{\text{gesamt}})} \quad (38)$$

Durch Division mit der Molmasse von Na₂GG erhält man daraus die Stoffmenge an M²⁺-bindender Guluronsäure (H₂GG) in der Säule.

$$n(\text{H}_2\text{GG}_{\text{Säule}}) = \frac{m(\text{Na}_2\text{GG}_{\text{tatsächlich}})}{M(\text{Na}_2\text{GG})} = \frac{m(\text{Na}_2\text{GG}_{\text{tatsächlich}})}{396,215 \text{ g/mol}} \quad (39)$$

Nach dem auf Grant et al. (1973, S. 197) zurückgehenden Eierkarton-Modell wird ein Ca²⁺-Kation jeweils durch vier Guluronat-Reste koordiniert. Folglich ist die theoretisch in der Säule bindbare Stoffmenge an Calcium-Ionen genau halb so groß wie $n(\text{H}_2\text{GG}_{\text{Säule}})$.

$$n(\text{Ca}^{2+}_{\text{bindbar}}) = 0,5 \cdot n(\text{H}_2\text{GG}_{\text{Säule}}) \quad (40)$$

Der H₂GG-Überschuss berechnet sich dann aus dem Quotienten von $n(\text{Ca}^{2+}_{\text{bindbar}})$ und der theoretischen Calcium-Stoffmenge die mit der Analysenprobe auf die Säule gebracht wird.

$$\text{H}_2\text{GG-Überschuss} = \frac{n(\text{Ca}^{2+}_{\text{bindbar}})}{n(\text{Ca}^{2+}_{\text{theoretisch}})} \quad (41)$$

Um die Wiederfindungsraten für Calcium-Ionen zu verbessern, wird in Folgeexperimenten versucht, die Säulenkapazität durch verschiedene Maßnahmen zu steigern:

Die Erhöhung der Konzentration der für die Gelkugel-Herstellung verwendeten Natriumalginat-Lösung auf $\rho^* = 30$ bzw. 40 g/L zeigt keine Erfolge, da die betreffenden Sole über so hohe Viskositäten verfügen, dass sich beim Austritt aus der Spritzenöffnung keine Tropfen mehr bilden. Durch die Kanüle lassen sich die hochkonzentrierten Lösungen nur noch unter Aufwendung eines extrem hohen Druckes pressen, wodurch die Anfertigung der Alginsäure-Kugeln viel zu arbeits- und zeitaufwändig wird.

Auch die Verwendung von in Wasser gequollenem Alginsäure-Pulver mit hohem Guluronat-Gehalt („Protacid F 120“, Firma FMC BioPolymer) stellt sich als nicht praktikabel heraus, da die Säule nur schwierig passierbar ist und das Eluat Trübungen durch feine Alginsäure-Partikel aufweist.

Deutlich verbesserte Alginsäure-Füllungen lassen sich erst durch Anwendung eines Verfahrens herstellen, das von Chen und Peng (2000, S. 440) für die Anfertigung kleiner Calciumalginat-Partikel entwickelt wurde, die man für die Reinigung schwermetallhaltiger Abwässer einsetzen kann.

In Abwandlung dieser Methode erfolgt in der vorliegenden Arbeit die Herstellung von Alginsäure-Partikel durch Einsieben von festem, guluronatreichem Natriumalginat in verdünnte Salzsäure ($c = 1$ mol/L). Die damit verbundenen Arbeitsschritte werden detailliert in Experiment 31 a) beschrieben.

Aufgrund der Tatsache, dass das eingesetzte Natriumalginat („Protanal LF 20/40“, Firma FMC Biopolymer, w (GG) = 0,55 – 0,60) relativ ungleichmäßig vermahlen ist (Korngröße: 20 – 40 mesh BS, d. h. 0,82 – 0,42 mm lichte Maschenweite), verfügen die nach Aushärten in der Salzsäure erhaltenen Alginsäure-Partikel über sehr unterschiedliche Durchmesser. Sie können daher in neutral gewaschener Form nicht direkt als Ionenaustauschermaterial im Säulenbetrieb zum Einsatz kommen, weil durch sehr feine Partikel Verstopfungen verursacht werden. Die Durchflussgeschwindigkeiten der Säulen sind dann nicht mehr ausreichend groß.

Im Rahmen dieser Arbeit wird daher eine einfache Methode zur Abtrennung feiner Alginsäure-Partikel entwickelt: Gemäß der Arbeitsvorschrift in Experiment 31 a) siebt man zunächst 25 g Natriumalginat („Protanal LF 20/40“, Firma FMC BioPolymer) unter Rühren in 600 mL Salzsäure ($c = 1$ mol/L) ein. Nach einer Aushärtezeit von einer Stunde werden die Alginsäure-Partikel mittels Schnelllauftrichter und Faltenfilter von der Säure abfiltriert und so lange mit entionisiertem Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Filtrates um 6 liegt. Die Abtrennung der Partikel unter Einsatz von Büchnertrichter und Membranpumpe hat sich nicht bewährt, da unter diesen Bedingungen Probleme mit verstopften Filtern auftreten.

Durch Wägung bestimmt man dann die Gesamtmasse der neutral gewaschenen Alginsäure-Partikel und überführt sie möglichst vollständig in ein 1-L-Becherglas. Die nach Zuzügen von 600 mL entionisiertem Wasser resultierende Suspension wird mittels Magnet-rührer und Rührfisch gründlich durchmischt. Nach einer Sedimentationszeit von 80 Sekunden dekantiert man die Mischung.

Im festen Rückstand liegen grobe Alginsäure-Partikel vor, die sich für den Säulenbetrieb eignen. Die im Überstand befindlichen Schwebeteilchen verfügen über so geringe Durchmesser, dass sie zu Durchflussstörungen führen. Ihre Masse wird nach Filtration über einen Faltenfilter bestimmt, damit man auf die Menge der tatsächlich in der Säule vorliegenden Alginsäure-Partikel rückschließen kann. Für die Berechnung von m ($\text{Alginsäure}_{\text{Säule}}$) sei auf Gleichung (37) verwiesen.

Die nach der oben beschriebenen Methode hergestellten und von Teilchen mit geringer Korngröße befreiten Alginsäure-Partikel werden nun in Versuchsreihen als Ionenaustauschermaterial für Calcium-Bestimmungen eingesetzt. Tabelle 28 gibt einen Überblick über die dabei erhaltenen Ergebnisse:

Mit Säule 1 erzielt man – trotz eines gegenüber den Gelkugeln mehr als verdoppelten H_2GG -Überschusses – zunächst nur eine niedrige Wiederfindung (vgl. a): 70,8 %. Wie sich aber in Folgeversuchen herausstellt, ist es bei den Alginsäure-Partikeln entscheidend, die Säulenfüllung vor Verwendung mit Salzsäure zu regenerieren und dann neutral gewaschen für die eigentliche Bestimmung einzusetzen. In Serientests hat sich ein Volumen von 250 mL Salzsäure ($c = 4 \text{ mol/L}$) als besonderes geeignet für diese Vorbehandlung erwiesen. Mit so präparierten Säulen lassen sich schon mehr als 90 % der theoretischen Ca^{2+} -Stoffmenge titrimetrisch wieder finden (vgl. Säule 1 d)).

Wie außerdem aus Tabelle 28 ersichtlich, resultiert eine weitere Verbesserung der Bestimmungsergebnisse aus der Verringerung der aufgebrauchten Ca^{2+} -Mengen (vgl. Säulen 2 und 3). Durch die damit verbundene Erhöhung der H_2GG -Überschüsse und somit auch der Bindungskapazität für Calcium-Ionen werden deutlich niedrigere Abweichungen zwischen den praktisch bestimmten und theoretischen Erdalkalimetall-Gehalten der Proben erreicht.

Tab. 28: Ergebnisse von ersten Versuchen zur Calcium-Bestimmung mit Alginsäure-Partikeln im Säulenbetrieb.

	Säule 1	Säule 2	Säule 3
Eingesetzte CaCl₂-Lösung			
ρ^* (Ca ²⁺ _{theoretisch})/g · l ⁻¹	10	10	10
V (Probe)/mL	a) – d): 5	a) u. b): 3 c) u. d): 2	a) u. b): 3 c) u. d): 2
n (Ca²⁺_{theoretisch})/mol in der Probe	a) – d): 0,00125	a) u. b): 0,00075 c) u. d): 0,00050	a) u. b): 0,00075 c) u. d): 0,00050
Säule mit Alginsäure-Partikeln			
n (H₂GG_{Säule})/mol	0,02891	0,02776	0,03246
n (Ca²⁺_{bindbar})/mol	0,01446	0,01388	0,01623
H₂GG-Überschuss^a	11,6-fach	a) u. b): 18,5-fach c) u. d): 27,8-fach	a) u. b): 21,6-fach c) u. d): 32,5-fach
Einsatzform	a) Nicht regenerierte Säule b) Regeneration mit 250 mL Salzsäure (c = 2 mol/L) c) wie b) d) Regeneration mit 250 mL Salzsäure (c = 4 mol/L)	a) – d): Regeneration mit 250 mL Salzsäure (c = 4 mol/L)	a) – d): Regeneration mit 250 mL Salzsäure (c = 4 mol/L)
Wiederfindung	a) 70,8 %	a) 96,8 %	a) 97,5 %
$\frac{n(\text{Ca}^{2+}_{\text{praktisch}}) \cdot 100 \%}{n(\text{Ca}^{2+}_{\text{theoretisch}})}$	b) 89,2 % c) 90,8 % d) 92,0 %	b) 96,3 % c) 98,0 % d) 99,0 %	b) 97,5 % c) 98,0 % d) 99,0 %

^a Bezogen auf die theoretische Stoffmenge an Calcium-Ionen im angegebenen Probenvolumen; zur Berechnung vgl. S. 150.

Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode

Um zu überprüfen, ob die für Calcium-Ionen optimierte Methode zur Bestimmung von M²⁺-Kationen (M²⁺ = Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺) mit Alginsäure-Kationenaustauschern reproduzierbare Ergebnisse liefert, werden Versuchsreihen mit Erdalkalimetall-Maßlösungen bekannten Gehaltes durchgeführt.

Die jeweils eingesetzten Alginsäure-Partikel stellt man wie in Experiment 31 a) beschrieben her. Die Bestimmungen erfolgen dann gemäß der Arbeitsvorschrift in Experiment 31 b) – d). Wenn abweichend von der dort angegebenen Vorgehensweise andere Probenvolumina als 20 mL untersucht werden, wird dies in den Ergebnistabellen vermerkt.

(1) Calcium-Bestimmungen

Aus der ausstehenden Calciumchlorid-Maßlösung ($\rho^*(\text{Ca}^{2+}) = 10 \text{ g/L}$) werden durch Verdünnung drei Lösungen mit Massenkonzentrationen von $\rho^*(\text{Ca}^{2+}) = 0,5 \text{ g/L}$, $1,0 \text{ g/L}$ bzw. $1,5 \text{ g/L}$ angesetzt. Für die Ca^{2+} -Bestimmungen nach Experiment 31 kommen jeweils 20-mL-Proben dieser Lösungen zum Einsatz. Die theoretischen Ca^{2+} -Stoffmengen pro Probe liegen also bei $n = 0,0025 \text{ mol}$, $0,00050 \text{ mol}$ bzw. $0,00075 \text{ mol}$.

Tabelle 29 a) fasst die Bestimmungsergebnisse zusammen. Die in Spalte 9 aufgeführten Wiederfindungsraten geben jeweils an, wie viel Prozent der theoretisch in den Proben vorliegenden Ca^{2+} -Masse praktisch unter Anwendung der Methode gefunden werden.

Um die Eindeutigkeit der Arbeitsvorschrift zu überprüfen und persönliche Fehler auszuschließen, wird die Methode auch von einer Mitarbeiterin getestet. Tabelle 29 b) gibt einen Überblick über die dabei erhaltenen Versuchsergebnisse.

Tab. 29 a): Calcium-Bestimmungen – Versuche zur Reproduzierbarkeit, Teil 1 (zur Beschreibung der Methode vgl. Experiment 31).

Calciumchlorid-Lösung				Alginsäure-Partikel		Titration mit $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ ($c = 0,1 \text{ mol/L}$, t)		Ergebnis
Se- rie Nr.	Pro- be Nr.	Konzen- tration $\rho^*(\text{Ca}^{2+})/mol \cdot L^{-1}$	Proben- größe V/mL	Säule Nr.	Über- schuss ^a H ₂ GG	Verbrauch V/mL	Titer t	Wieder- findung ^b %
1	1	0,5	20	Ca-1	65-fach	4,95	1,005	99,7
	2					5,00		100,7
	3					5,00		100,7
	4					5,025	1,015	102,2
	5					4,95		100,7
	6					5,00		101,7
2	1	1,0	20	Ca-2	32-fach	9,875	1,008	99,7
	2					9,875		99,7
	3					9,975		100,7
	4					9,80		99,0
	5					9,95		100,5
	6					9,85		99,5
3	1	1,5	20	Ca-3	23-fach	14,85	1,013	100,2
	2					14,75		99,5
	3					14,775	1,010	99,8
	4					14,825		100,0
	5					14,90		100,5
	6					14,80		99,8

^a Bezogen auf die theoretische Stoffmenge an Calcium-Ionen im angegebenen Probenvolumen; zur Berechnung vgl. S. 150.

^b Wiederfindung = $\frac{\text{Praktisch ermittelte Calcium-Masse in mg/20 mL} \cdot 100 \%}{\text{Theoretische Calcium-Masse in mg/20 mL}}$

Tab. 29 b): Calcium-Bestimmungen – Versuche zur Reproduzierbarkeit, Teil 2 (zur Vorgehensweise vgl. Experiment 31) (vgl. Claußen/Marburger 2001, S. 55 – 57).

Calciumchlorid-Maßlösung				Alginsäure-Partikel		Titration mit NaOH _(aq) (c = 0,1 mol/L, t)		Ergebnis
Se- rie	Pro- be	Konzen- tration	Proben- größe	Säule	Über- schuss ^a	Verbrauch	Titer	Wieder- findung ^b
Nr.	Nr.	$\rho^* (\text{Ca}^{2+}) / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	V/mL	Nr.	H ₂ GG	V/mL	t	%
1'	1	0,5	20	Ca-4	66-fach	4,95	0,995	98,7
	2					4,95		98,7
	3					4,90		97,7
	4					4,90		97,7
	5					5,00		100,0
	6					5,00		100,0
2'	1	1,0	20	Ca-5	33-fach	9,95	1,010	100,7
	2					10,00		101,2
	3					10,00	0,995	99,7
	4					10,05		100,2
	5					10,05		100,2
	6					10,05		100,2
3'	1	1,5	20	Ca-6	22-fach	14,85	1,013	100,5
	2					14,94	1,010	100,8
	3					14,80		99,8
	4					14,825		100,0
	5					14,90		100,5
	6					14,80		98,9

^a Bezogen auf die theoretische Stoffmenge an Calcium-Ionen im angegebenen Probenvolumen; zur Berechnung vgl. S. 150.

^b Wiederfindung = $\frac{\text{Praktisch ermittelte Calcium-Masse in mg/20 mL} \cdot 100 \%}{\text{Theoretische Calcium-Masse in mg/20 mL}}$

Die in den Tabellen 29 a) und b) angegebenen experimentellen Ergebnisse sollen im Folgenden statistisch ausgewertet werden. Dazu berechnet man zunächst für jede Bestimmungsserie den arithmetischen Mittelwert \bar{x} der Wiederfindungsraten nach Gleichung (42) (Gottwald 2000, S. 18):

Mittelwert \bar{x} : (42)

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$$

N = Anzahl der Messwerte

x_i = i-ter Messwert

Die Streuung der Messwerte um Ihren Mittelwert wird durch Berechnung der Standardabweichung s_x ermittelt (Gottwald 2000, S. 27):

Standardabweichung s_x : (43)

$$s_x = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum (x_i - \bar{x})^2}$$

Da bei einer relativ kleinen Anzahl von Messwerten die Gesetzmäßigkeiten der Normalverteilung nicht gültig sind, wird als Verteilungsfunktion der Mittelwerte die so genannte t-Verteilung (Synonym: Student-Verteilung) zugrundegelegt, deren Form vom Freiheitsgrad f abhängt (Gottwald 2000, S. 51 ff.). Wie aus Gleichung (44) ersichtlich ist, gibt f die Anzahl der Wiederholungsmessungen an (Gottwald 2000, S. 25):

Freiheitsgrad f : (44)

$$f = N - 1$$

Bereits bei einem Freiheitsgrad von $f = 12$ sieht die t-Verteilung ähnlich aus wie die Normalverteilung und geht bei $f = \infty$ vollständig in diese über.

Für eine Stichprobenreihe lässt sich gemäß Gleichung (45) der Vertrauensbereich des Mittelwertes VB berechnen (Gottwald 2000, S. 55):

Vertrauensbereich des Mittelwertes VB:

$$VB = \pm \frac{t \cdot s_x}{\sqrt{N}} \quad (45)$$

Der dafür benötigte Wert der Variablen t kann der im Anhang aufgeführten t-Tabelle (vgl. Teil G) entnommen werden. Er hängt außer vom Freiheitsgrad f auch noch von der statistischen Sicherheit P (= 95, 99 oder 99,9 %) ab, mit der eine Aussage getroffen werden soll. Der Vertrauensbereich gibt das Intervall um den Mittelwert \bar{x} an, das mit der gewählten Wahrscheinlichkeit von $P = 95, 99$ oder $99,9$ % den wahren Wert μ enthält.

Wenn die Mittelwerte zweier Bestimmungsserien nicht signifikant voneinander abweichen kann man sie zu einem gemeinsamen Wert zusammenfassen (Gottwald 2000, S. 78):

Gemeinsamer Mittelwert \bar{x}_G :

$$\bar{x}_G = \frac{N_1 \cdot \bar{x}_1 + N_2 \cdot \bar{x}_2}{N_1 + N_2} \quad (46)$$

$\bar{x}_1, \bar{x}_2 =$ Mittelwerte der ersten bzw. zweiten Stichprobenreihe

$N_1, N_2 =$ Anzahl der Messwerte der ersten bzw. zweiten Stichprobenreihe

Um zu überprüfen, ob signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten zweier Stichprobenreihen vorliegen, wird der Mittelwert-t-Test angewandt (Signifikanzschranke: $P = 99$ %) (vgl. Gottwald 2000, S. 76 ff.). Eine weitere Voraussetzung für die Zulässigkeit der Mittelwert-Zusammenlegung besteht darin, dass die Standardabweichung der beiden Serien keine signifikanten Unterschiede zeigen. Um dies zu überprüfen, dient der Varianzen-F-Test (Signifikanzschranke: $P = 99$ %) (vgl. Gottwald 2000, S. 74 ff.).

Aus den nicht signifikant verschiedenen s_x -Werten zweier Stichprobenreihen lässt sich wie folgt die mittlere, gewichtete Standardabweichung s_D ermitteln (Gottwald 2000, S. 77):

Mittlere, gewichtete Standardabweichung s_D :

$$s_D = \sqrt{\frac{s_1^2 \cdot (N_1 - 1) + s_2^2 \cdot (N_2 - 1)}{N_1 + N_2 - 2}} \quad (47)$$

$s_1, s_2 =$ Standardabweichungen der ersten bzw. zweiten Stichprobenreihe

Auch für den gemeinsamen Mittelwert \bar{x}_G zweier Messreihen kann ein Vertrauensbereich angegeben werden (Gottwald 2000, S. 79). Dieser berechnet sich gemäß Gleichung (48) zu:

Vertrauensbereich des gemeinsamen Mittelwertes \bar{x}_G :

$$VB_G = \pm \frac{t \cdot s_D}{\sqrt{N}} \quad (48)$$

Auf analoge Weise verfährt man bei der Zusammenlegung der Daten mehrerer Stichprobenreihen, bei denen keine signifikanten Mittelwertsunterschiede festzustellen sind.

Unter Anwendung der vorstehend erläuterten Gleichungen erhält man bei der statistischen Auswertung der Versuche zur Reproduzierbarkeit der quantitativen Calcium-Bestimmungen (vgl. Tabellen 29 a) und b)) die in Tabelle 30 zusammengestellten Werte:

Tab. 30: Statistische Auswertung der Versuche zur Reproduzierbarkeit der Calcium-Bestimmung (Teile 1 und 2).

Serie ^a Nr.	CaCl ₂ - Maßlösung $\rho^* (\text{Ca}^{2+})/$ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Mittelwert ^b der Wiederfindungs- raten \bar{x}	Standard- abweichung s_x	Vertrauensbereich	
				P = 95 %	P = 99 %
1	0,5	100,95 %	0,88 %	±0,92 %	±1,45 %
1'		98,80 % ^c	1,03 %	±1,08 %	±1,70 %
		— ^c	— ^c	— ^c	— ^c
2	1,0	99,85 %	0,64 %	±0,67 %	±1,05 %
2'		100,37 %	0,52 %	±0,55 %	±0,86 %
		$\bar{x}_G = 100,11 \%$	$s_D = 0,58 \%$	$VB_G = \pm 0,37 \%$	$VB_G = \pm 0,53 \%$
3	1,5	99,97 %	0,35 %	±0,37 %	±0,58 %
3'		100,08 %	0,69 %	±0,72 %	±1,14 %
		$\bar{x}_G = 100,03 \%$	$s_D = 0,55 \%$	$VB_G = 0,35 \%$	$VB_G = \pm 0,50 \%$

^a Zur Nummerierung der Serien vgl. Tabellen 29 a) und b).

^b Gemäß Gottwald (2000, S. 18) gibt man den Mittelwert gewöhnlich mit einer Nachkommastelle mehr als die Messwerte an.

^c Der Mittelwert der Serie 1' weicht signifikant von den für die Versuchsreihen 1, 2' und 3' bestimmten \bar{x} -Werten ab. Da dies auf das Vorliegen eines systematischen Fehlers hindeutet, bleibt die Serie 1' bei der Ermittlung gemeinsamer Mittelwerte und deren Vertrauensbereiche sowie bei der Bestimmung durchschnittlicher, gewichteter Standardabweichungen unberücksichtigt.

Für die Gesamtheit der Ca^{2+} -Bestimmungen in allen Konzentrationsbereichen (Serien 1, 2, 2', 3, 3') ergibt sich ein gemeinsamer Mittelwert der Wiederfindungsraten von $\bar{x}_G = 100,24\%$ mit einem Vertrauensbereich von $\text{VB}_G = \pm 0,24\%$ ($f = 25$, $P = 95\%$) bzw. $\pm 0,33\%$ ($f = 25$, $P = 99\%$). Die durchschnittliche, gewichtete Standardabweichung beträgt $s_D = 0,64\%$.

(2) Strontium-Bestimmungen

Die in Experiment 31 beschriebene Methode wird anschließend auch für quantitative Sr^{2+} -Bestimmungen angewandt. Auf die beiden eingesetzten Säulen (Sr-1 und Sr-2) gibt man hier 20-mL-Proben einer neutralen Strontiumchlorid-Maßlösung ($\rho^* = 2,0\text{ g/L}$), die jeweils $0,00046\text{ mol Sr}^{2+}$ enthalten. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 31.

Tab. 31: Strontium-Bestimmungen – Versuche zur Reproduzierbarkeit (zur Methode vgl. Experiment 31).

Strontiumchlorid-Maßlösung				Alginsäure-Partikel		Titration mit $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ ($c = 0,1\text{ mol/L}$, t)		Ergebnis
Serie	Probe	Konzentration	Probengröße	Säule	Überschuss ^a	Verbrauch	Titer	Wiederfindung ^b
Nr.	Nr.	$\rho^* (\text{Sr}^{2+}) / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	V/mL	Nr.	H_2GG	V/mL	t	%
1	1	2,0	20	Sr-1	37-fach	9,10	1,000	99,7
	2					9,05		99,1
	3					9,15	1,007	100,9
	4							100,9
	5					9,15	1,003	100,5
	6					9,175		100,8
	7					9,05	1,006	99,7
	8			Sr-2	32-fach	9,05	1,000	99,1
	9					9,15		100,2
	10					9,05	1,007	99,8
	11					9,15		100,9
	12					9,05	1,003	99,4
	13					9,225	101,0	
	14					9,10	1,006	100,3

^a Bezogen auf die theoretische Stoffmenge an Strontium-Ionen im angegebenen Probenvolumen; zur Berechnung vgl. S. 150.

^b $\text{Wiederfindung} = \frac{\text{Praktisch ermittelte Strontium-Masse in mg/Probenvolumen} \cdot 100\%}{\text{Theoretische Strontium-Masse in mg/Probenvolumen}}$

Bei der statistischen Auswertung der Bestimmungsergebnisse ergeben sich die in Tabelle 32 aufgeführten Mittelwerte, Standardabweichungen und Vertrauensbereiche.

Tab. 32: Statistische Auswertung der Versuche zur Reproduzierbarkeit der Strontium-Bestimmung.

Se- rie ^a	SrCl ₂ - Maßlösung	Mittelwert der Wiederfindungs- raten	Standard- abweichung	Vertrauensbereich	
				VB	
Nr.	$\rho^*(\text{Sr}^{2+}) =$ 2,0 g/L	\bar{x}	s_x	P = 95 %	P = 99 %
1	2,0	100,16 %	0,69 %	±0,40 % (f = 13)	±0,56 % (f = 13)

^a Zur Serienbezeichnung vgl. Tabelle 31.

^b Gemäß Gottwald (2000, S. 18) gibt man den Mittelwert gewöhnlich mit einer Nachkommastelle mehr als die Messwerte an.

Für die nur in einem Konzentrationsbereich durchgeführten Strontium-Bestimmungen ergibt sich als Mittelwert der Wiederfindungsraten $\bar{x} = 100,16 \%$ mit einer Standardabweichung von $s_x = 0,69 \%$. Der Vertrauensbereich des Mittelwertes liegt bei $\text{VB}_G = \pm 0,40 \%$ ($f = 13$, $P = 95 \%$) bzw. $\pm 0,56 \%$ ($f = 13$, $P = 99 \%$).

(3) Barium-Bestimmungen

Für die Ba²⁺-Bestimmung mit Alginsäure-Kationenaustauschern wird als Ausgangslösung eine neutrale Bariumchlorid-Maßlösung ($c = 0,05 \text{ mol/L}$) verwendet, von der man in Teil 1 der Versuchreihe zur Reproduzierbarkeit jeweils Probenvolumina von 10 mL auf die vorbereiteten Säulen (Ba-1 – Ba-5) aufbringt. Diese enthalten Ba²⁺-Stoffmengen von je 0,00050 mol. Die Ergebnisse der Bestimmungen werden in Tabelle 33 a) wiedergegeben. Weitere Untersuchungen werden mit je 20 mL von Ba²⁺-Lösungen der Konzentrationen $c = 0,0125 \text{ mol/L}$, $0,025 \text{ mol/L}$ und $0,0375 \text{ mol/L}$ durchgeführt, die durch Verdünnung aus der Ausgangslösung herzustellen sind. Die jeweils in den Ba²⁺-Proben vorliegenden Stoffmengen entsprechen mit $n(\text{Ba}^{2+}) = 0,00025 \text{ mol}$, $0,00050 \text{ mol}$ bzw. $0,00075 \text{ mol}$ den bei den Ca²⁺-Versuchen eingesetzten (vgl. dazu Tabellen 29 a) und b)). Die Ergebnisse der Ba²⁺-Bestimmungen mit drei unterschiedlich konzentrierten Lösungen werden in Tabelle 33 b) zusammengefasst.

Tab. 33 a): Barium-Bestimmungen – Versuche zur Reproduzierbarkeit, Teil 1 (zur Vorgehensweise vgl. Experiment 31).

Bariumchlorid-Lösung				Alginsäure-Partikel		Titration mit NaOH _(aq) (c = 0,1 mol/L, t)		Ergebnis
Se- rie	Pro- be	Konzen- tration	Proben- größe	Säule	Über- schuss ^a	Verbrauch	Titer	Wieder- findung ^b
Nr.	Nr.	c (Ba ²⁺)/ mol · L ⁻¹	V/mL	Nr.	H ₂ GG	V/mL	t	%
1	1	0,05	10	Ba-1	33-fach	10,05	1,006	101,3
	2					10,05		101,3
	3					1,008	9,90	100,0
	4						9,85	99,5
	5						9,70	98,0
	6						9,85	99,5
	7			Ba-2	30-fach	9,825	1,000	98,2
	8					10,00		100,0
	9					9,85	1,003	98,8
	10			Ba-3	33-fach	10,20	1,000	102,0
	11					9,775		97,7
	12					9,75		97,5
	13			Ba-4	34-fach	10,20	1,000	102,0
	14					10,10		101,0
	15					9,90		99,0
	16					10,15		1,003
	17			Ba-5	34-fach	9,95	1,003	99,8
	18					10,05		100,8

^a Bezogen auf die theoretische Stoffmenge an Barium-Ionen im angegebenen Probenvolumen; zur Berechnung vgl. S. 150.

^b Wiederfindung = $\frac{\text{Praktisch ermittelte Barium-Masse in mg/Probenvolumen} \cdot 100 \%}{\text{Theoretische Barium-Masse in mg/Probenvolumen}}$

Tab. 33 b): Barium-Bestimmungen – Versuche zur Reproduzierbarkeit, Teil 2 (zur Arbeitsweise vgl. Experiment 31).

Bariumchlorid-Lösung				Alginsäure-Partikel		Titration mit NaOH _(aq) (c = 0,1 mol/L, t)		Ergebnis
Se- rie	Pro- be	Konzen- tration	Proben- größe	Säule	Über- schuss ^a	Verbrauch	Titer	Wieder- findung ^b
Nr.	Nr.	c (Ba ²⁺)/ mol · L ⁻¹	V/mL	Nr.	H ₂ GG	V/mL	t	%
2	1	0,0125	20	Ba-6	64-fach	5,50	1,002	101,2
	2			Ba-8	68-fach	5,05		101,2
	3			Ba-9	68-fach	5,10		102,2
3	1	0,0250		Ba-6	32-fach	10,30	0,998	102,8
	2			Ba-7	31-fach	10,05		100,3
	3			Ba-8	34-fach	10,125		101,0
	4			Ba-9	34-fach	10,125		101,0
4	1	0,0375		Ba-6	22-fach	15,00	1,015	101,5
	2			14,80		1,007	99,4	
	3			Ba-7	20-fach	15,125	1,015	102,3
	4			14,65		1,007	98,3	
	5			Ba-8	23-fach	15,125	1,015	102,3
	6		14,65	1,007		98,3		
	7		Ba-9	23-fach	15,05	1,015	101,8	
	8		14,80		1,007	99,2		

^a Bezogen auf die theoretische Stoffmenge an Barium-Ionen im angegebenen Probenvolumen; zur Berechnung vgl. S. 150.

^b Wiederfindung = $\frac{\text{Praktisch ermittelte Barium-Masse in mg/Probenvolumen} \cdot 100 \%}{\text{Theoretische Barium-Masse in mg/Probenvolumen}}$

Die vier Versuchsserien zur Reproduzierbarkeit der Barium-Bestimmungen mittels Alginsäure-Kationenaustauschern werden wiederum unter Anwendung der Gleichungen (42) – (48) statistisch ausgewertet. Die dabei erhaltenen Ergebnisse finden sich in Tabelle 34.

Tab. 34: Statistische Auswertung der Versuche zur Reproduzierbarkeit der Barium-Bestimmungen (Teile 1 und 2).

Serie ^a	BaCl ₂ -Maßlösung		Mittelwert ^b der Wiederfindungsraten \bar{x}	Standardabweichung s_x	Vertrauensbereich	
	Nr.	c (Ba ²⁺)/ mol · L ⁻¹			V/mL	VB
					P = 95 %	P = 99 %
1	0,0500	10	99,90 %	1,49 %	±0,74 % (f = 17)	±1,05 % (f = 17)
			–	–	–	–
2	0,0125	20	101,53 %	0,58 %	±1,44 % (f = 2)	±3,32 % (f = 2)
3	0,0250		101,28 %	1,07 %	±1,70 % (f = 3)	±3,12 % (f = 3)
4	0,0375		100,39 %	1,76 %	±1,47 % (f = 7)	±2,17 % (f = 7)
			$\bar{x}_G = 100,86 \%$	$s_D = 1,47 \%$	$VB_G = \pm 0,83 \%$ (f = 12)	$VB_G = \pm 1,16 \%$ (f = 12)

^a Zur Nummerierung der Serien vgl. Tabellen 33 a) und b).

^b Gemäß Gottwald (2000, S. 18) gibt man den Mittelwert gewöhnlich mit einer Nachkommastelle mehr als die Messwerte an.

Für die Gesamtheit aller Barium-Bestimmungen (Serien 1 – 4) erhält man einen gemeinsamen Mittelwert von $\bar{x}_G = 100,33 \%$ und eine durchschnittliche, gewichtete Standardabweichung von $s_D = 1,48 \%$. Der Vertrauensbereich des gemeinsamen Mittelwertes liegt bei $VB_G = \pm 0,53 \%$ ($f = 29$, $P = 95 \%$) bzw. $\pm 0,71 \%$ ($f = 29$, $P = 99 \%$).

Analysen

Die praktische Anwendbarkeit der Methode für die quantitative Bestimmung von Erdalkalimetall-Kationen ($M^{2+} = Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}$) wird abschließend anhand von Analysenproben mit unbekanntem Calcium-, Strontium- und Barium-Gehalten untersucht.

Gemäß den in Vorversuchen getesteten Bestimmungsgrenzen für Calcium- und Barium-Ionen, soll die M^{2+} -Konzentration der eingesetzten Lösungen $c = 0,0125 \text{ mol/L} - 0,0375 \text{ mol/L}$ betragen. Die Analysenproben werden von einer zweiten Person in 100-mL-Kolben ausgegeben. Dafür stehen aus Ampullen angesetzte neutrale Calcium-, Strontium- und Bariumchlorid-Maßlösungen zur Verfügung.

Nach Auffüllen der Analysenlösung auf ein Gesamtvolumen von 100 mL, kommen für die Bestimmungen jeweils 20-mL-Proben zum Einsatz. Diese enthalten zwischen 0,00025 mol und 0,00075 mol des entsprechenden Erdalkalimetall-Kations.

Bei der Bestimmung geht man nach der in Experiment 31 a) – d) beschriebenen Arbeitsvorschrift vor. Um möglichst viele Messwerte zu erhalten, werden zunächst vier 20-mL-

Proben der jeweiligen Analyseprobe an verschiedenen Säulen auf ihren Gehalt an Erdalkalimetall-Kationen untersucht. Erst dann vergleicht man die praktisch ermittelten M^{2+} -Gehalte pro 100 mL Analysenlösung mit den theoretischen zu erwartenden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen getrennt nach Kationen diskutiert.

(1) Calcium-Analysen

Die Ergebnisse der Ca^{2+} -Bestimmungen sind in den Tabellen 35 a) und b) zusammengestellt.

Tab. 35 a): Calcium-Bestimmungen – Analysen, Teil 1 (0,00125 – 0,0025 mol Calcium-Ionen pro 100 mL Analysenlösung) (zu den Details der Durchführung vgl. Experiment 31).

Analysenlösung				Alginsäure-Partikel		Ca ²⁺ -Gehalt pro 100-mL-Probe		Ergebnis
Se- rie	Pro- be	Konzentra- tionsbereich	Pro- ben- größe	Säule	Über- schuss ^a	Praxis	Theo- rie	Wieder- findung ^b
Nr.	Nr.	c (Ca ²⁺)/ mol · L ⁻¹	V/mL	Nr.	H ₂ GG	m/mg	m/mg	%
1	1	0,0125 – 0,0250	20	Ca-7	63-fach	53,46	52,52	101,8
	2			Ca-8	66-fach	53,71	52,52	102,3
	3			Ca-9	57-fach	53,71	52,52	102,3
	4			Ca-10	60-fach	53,46	52,52	101,8
2	1	0,0125 – 0,0250	20	Ca-11	54-fach	59,96	59,65	100,5
	2			Ca-12	56-fach	59,96	59,65	100,5
	3			Ca-11	54-fach	60,72	59,65	101,3
	4			Ca-12	56-fach	61,43	59,65	103,0
3	1	0,0125 – 0,0250	20	Ca-7	35-fach	92,58	92,09	100,5
	2			Ca-8	37-fach	94,09	92,09	102,2
	3			Ca-9	32-fach	92,58	92,09	100,5
	4			Ca-10	34-fach	92,33	92,09	100,3

^a Bezogen auf die in einer 20-mL-Probe der Analysen-Lösung theoretisch enthaltene Stoffmenge an Calcium-Ionen; zur Berechnung vgl. S. 150.

^b Wiederfindung = $\frac{\text{Praktisch ermittelte Calcium-Masse in mg/100 mL} \cdot 100 \%}{\text{Theoretische Calcium-Masse in mg/100 mL}}$

Tab. 35 b): Calcium-Bestimmungen – Analysen, Teil 2 (0,0025 – 0,00375 mol Calcium-Ionen pro 100 mL Analysen-Lösung) (zur Arbeitsweise vgl. Experiment 31).

Analysenlösung				Säule mit Alginsäure-Partikeln		Ca ²⁺ -Gehalt pro 100-mL-Probe		Ergebnis
Se- rie	Pro- be	Konzentra- tionsbereich	Pro- ben- größe	Typ	Über- schuss ^a	Praxis	Theo- rie	Wieder- findung ^b
Nr.	Nr.	c (Ca ²⁺)/ mol · L ⁻¹	V/mL	Nr.	H ₂ GG	m/mg	m/mg	%
4	1	0,0250 – 0,0375	20	Ca-7	32-fach	103,35	101,54	101,8
	2			Ca-8	34-fach	101,80	101,54	99,7
	3			Ca-7	32-fach	102,46	101,54	100,9
	4			Ca-8	34-fach	103,46	101,54	101,9
5	1	0,0250 – 0,0375	20	Ca-11	27-fach	117,40	118,97	98,7
	2			Ca-12	27-fach	118,89	118,97	99,9
	3			Ca-11	27-fach	117,90	118,97	99,1
	4			Ca-12	27-fach	117,40	118,97	98,7
6	1	0,0250 – 0,0375	20	Ca-7	23-fach	139,89	139,46	100,3
	2			Ca-8	24-fach	139,64	139,46	100,1
	3			Ca-9	21-fach	141,39	139,46	101,4
	4			Ca-10	22-fach	139,64	139,46	100,1

^a Bezogen auf die in einer 20-mL-Probe der Analysen-Lösung theoretisch enthaltene Stoffmenge an Calcium-Ionen; zur Berechnung vgl. S. 150.

^b Wiederfindung = $\frac{\text{Praktisch ermittelte Calcium-Masse in mg/100 mL} \cdot 100 \%}{\text{Theoretische Calcium-Masse in mg/100 mL}}$

Die bei den Analysen erhaltenen experimentellen Daten werden durch Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Vertrauensbereiches statistisch ausgewertet. Die resultierenden Werte sind in Tabelle 36 zusammengestellt:

Die Ergebnisse der Bestimmungen mit Calcium-Gehalten unter 0,00250 mol Ca²⁺ pro 100 mL Analysenlösung (Serien 1 – 3) können nicht mit denen der Versuche mit höher konzentrierten Analysenproben (Serien 4 - 6) zusammengefasst werden, da die jeweils errechneten gemeinsamen Mittelwerte $\bar{x}_G = 101,42 \%$ (Serien 1 – 3) und $\bar{x}_G = 100,22 \%$ (Serien 4 – 6) signifikant voneinander abweichen.

Wie bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse in Tabelle 36 deutlich wird, weisen die Analysen mit geringen Calcium-Gehalten (Serien 1 – 3) insgesamt etwas größere Abweichungen von den theoretischen Werten auf. Die möglichen Ursachen für diese Diskrepanz sollen im Folgenden kurz diskutiert werden:

Im Falle der niedrig konzentrierten Calcium-Proben erhält man bei der Kationenaustauschreaktion Eluate, die nur über sehr geringe Salzsäure-Gehalte verfügen. Die saubere Erfassung des Endpunktes wird folglich erschwert.

Ein weiteres Problem besteht darin, dass die zur Titration des salzsauren Eluats verbrauchten Volumina an NaOH-Lösung ($c = 0,1 \text{ mol/L}$, t) nur zwischen 5 und 10 mL liegen. Dadurch haben kleine Fehler in der Arbeitsweise (z. B. Ablesungenauigkeiten an der Burette) wesentlich größere Effekte auf das Endergebnis als bei Analysen mit höheren Calcium-Gehalten (Verbrauch zwischen 10 und 15 mL Natronlauge).

Tab. 36: Statistische Auswertung der Calcium-Analysen (Teile 1 und 2).

Analysenlösung		Mittelwert ^b der Wiederfindungsraten \bar{x}	Standardabweichung s_x	Vertrauensbereich	
Serie Nr.	Ca ²⁺ -Gehalt pro 100-mL-Probe n/mol			VB	
				P = 95 %	P = 99 %
1	0,00125 – 0,00250	102,05 %	0,29 %	±0,46 % ($f = 3$)	±0,85 % ($f = 3$)
2		101,33 %	1,18 %	±1,88 % ($f = 3$)	±3,45 % ($f = 3$)
3		100,88 %	0,89 %	±1,42 % ($f = 3$)	± 2,60 % ($f = 3$)
		$\bar{x}_G = 101,42 \%$	$s_D = 0,87 \%$	$VB_G = \pm 0,57 \%$ ($f = 9$)	$VB_G = \pm 0,82 \%$ ($f = 9$)
4	0,00250 – 0,00375	101,08 %	1,02 %	±1,62 % ($f = 3$)	±2,98 % ($f = 3$)
5		99,10 %	0,57 %	±0,91 % ($f = 3$)	±1,66 % ($f = 3$)
7		100,48 %	0,62 %	±0,99 % ($f = 3$)	±1,81 % ($f = 3$)
		$\bar{x}_G = 100,22 \%$	$s_D = 0,76 \%$	$VB_G = 0,50 \%$ ($f = 9$)	$VB_G = \pm 0,71 \%$ ($f = 9$)

^a Zur Serienbezeichnung vgl. Tabellen 35 a) und b).

^b Gemäß Gottwald (2000, S. 18) gibt man den Mittelwert gewöhnlich mit einer Nachkommastelle mehr als die Messwerte an.

(2) Strontium-Bestimmungen

Auf analoge Weise werden anschließend Sr^{2+} -Analysenproben mit der entwickelten Methode untersucht. Tabelle 37 gibt Aufschluss über die dabei erhaltenen experimentellen Daten.

Tab. 37: Strontium-Bestimmungen – Analysen (zur Arbeitsweise vgl. Experiment 31).

Analysenlösung				Alginsäure-Partikel		Sr ²⁺ -Gehalt pro 100-mL-Probe		Ergebnis
Se- rie	Pro- be	Konzentra- tionsbereich	Pro- ben- größe	Säule	Über- schuss ^a	Praxis	Theo- rie	Wieder- findung ^b
Nr.	Nr.	c (Sr ²⁺)/ mol · L ⁻¹	V/mL	Nr.	H ₂ GG	m/mg	m/mg	%
1	1	0,0125 – 0,0250	20	Sr-3	36-fach	– ^c	191,86	– ^c
	2			Sr-4	31-fach	192,98	191,86	100,6
	3			Sr-5	39-fach	192,33	191,86	100,2
	4			Sr-6	39-fach	192,98	191,86	100,6
2	1	0,0125 – 0,0250	20	Ba-10 ^d	31-fach	216,48	212,93	101,7
	2			Ba-11 ^d	28-fach	210,95	212,93	99,1
	3			Ba-12 ^d	35-fach	212,61	212,93	99,8
	4			Ba-13 ^d	35-fach	213,16	212,93	100,1
3	1	0,0250 – 0,0375	20	Sr-3	28-fach	251,25	248,66	101,0
	2			Sr-4	24-fach	246,87	248,66	99,3
	3			Sr-5	30-fach	247,96	248,66	99,7
	4			Sr-6	30-fach	247,53	248,66	99,5
4	1	0,0250– 0,0375	20	Sr-3	26-fach	269,21	269,17	100,02
	2			Sr-4	22-fach	269,87	269,17	100,03
	3			Sr-5	28-fach	269,21	269,17	100,02
	4			Sr-6	28-fach	269,21	269,17	100,02
5	1	0,0250 – 0,0375	20	Sr-3	21-fach	337,99	335,95 ^e	100,6
	2			Sr-4	18-fach	336,90	335,95 ^e	100,3
	3			Sr-5	22-fach	337,34	335,95 ^e	100,4
	4			Sr-6	22-fach	335,80	335,95 ^e	99,96
6	1	0,0250 – 0,0375	20	Sr-3	21-fach	341,94	341,08 ^e	100,3
	2			Sr-4	17-fach	343,03	341,08 ^e	100,6
	3			Sr-5	22-fach	341,28	341,08 ^e	100,1
	4			Sr-6	22-fach	341,94	341,08 ^e	100,3

^a Bezogen auf die in einer 20-mL-Probe der Analysenlösung theoretisch enthaltene Stoffmenge an Strontium-Ionen; zur Berechnung vgl. S. 150.

^b Wiederfindung = $\frac{\text{Praktisch ermittelte Strontium-Masse in mg/100 mL} \cdot 100 \%}{\text{Theoretische Strontium-Masse in mg/100 mL}}$

^c Fehlbestimmung: Säule trocken gelaufen.

^d Die eingesetzten Säulen wurden vorher schon für Barium-Bestimmungen verwandt.

^e Die Strontium-Konzentration liegt mit $c = 0,0383 \text{ mol/L}$ (Serie 5) bzw. $c = 0,0389 \text{ mol/L}$ (Serie 6) etwas oberhalb des in Spalte 3 angegebenen Maximalwertes.

Die statistische Auswertung der Strontium-Analysen führt zu den in Tabelle 38 zusammengefassten Ergebnissen:

Tab. 38: Statistische Auswertung der Strontium-Analysen.

Analysenlösung		Mittelwert ^b der Wiederfindungsraten	Standardabweichung	Vertrauensbereich	
Serie Nr.	Sr ²⁺ -Gehalt pro 100-mL-Probe n/mol			\bar{x}	s_x
				P = 95 %	P = 99 %
1	0,00125 – 0,00250	100,47 %	0,23 %	±0,57 % (f = 2)	±1,32 % (f = 2)
2		100,18 %	1,10 %	±1,75 % (f = 3)	±3,21 % (f = 3)
		$\bar{x}_G = 100,30 \%$	$s_D = 0,86 \%$	$VB_G = \pm 0,84 \%$ (f = 5)	$VB_G = \pm 1,31 \%$ (f = 5)
3	0,00250 – 0,00375	99,88 %	0,77 %	±1,23 % (f = 3)	±2,25 % (f = 3)
4		100,02 % ^c	0,01 % ^c	±0,02 % (f = 3)	±0,03 % (f = 3)
5		100,32 %	0,27 %	±0,43 % (f = 3)	±0,79 % (f = 3)
6		100,33 %	0,21 %	±0,33 % (f = 3)	± 0,61% (f = 3)
		$\bar{x}_G = 100,18 \%^c$	$s_D = 0,49 \%^c$	$VB_G = \pm 0,32 \%^d$ (f = 9)	$VB_G = \pm 0,46 \%^d$ (f = 9)

^a Zur Serienbezeichnung vgl. Tabelle 37.

^b Gemäß Gottwald (2000, S. 18) gibt man den Mittelwert gewöhnlich mit einer Nachkommastelle mehr als die Messwerte an.

^c Für die Berechnung des gemeinsamen Mittelwertes und der durchschnittlichen, gewichteten Standardabweichung wurden nur die Serien 3, 5 und 6 berücksichtigt, da der s_x -Wert der Serie 4 hochsignifikant von den anderen abweicht.

^d Aus den in Anmerkung c genannten Gründen gilt der Vertrauensbereich des gemeinsamen Mittelwertes VB_G nur für die Serien 3, 5 und 6.

Für die Gesamtheit aller Strontium-Bestimmungen (Serien 1, 2, 3, 5 und 6) ergibt sich ein gemeinsamer Mittelwert der Wiederfindungsraten von $\bar{x}_G = 100,22 \%$. Die mittlere, gewichtete Standardabweichung beträgt $s_D = 0,65 \%$. Der Vertrauensbereich des gemeinsamen Mittelwertes liegt bei $VB_G = 0,32 \%$ ($f = 14$, $P = 95 \%$) bzw. $VB_G = 0,44 \%$ ($f = 14$, $P = 99 \%$).

Bei genauerer Betrachtung der Daten in Tabelle 38 wird deutlich, dass die experimentellen experimentellen Ergebnisse der Strontium-Analysen mit Gehalten zwischen 0,00125 und 0,0025 mol Sr^{2+} pro 100 mL (Serien 1 und 2) stärker von den theoretischen Werten abweichen als die Resultate der Bestimmungen mit höheren Konzentrationen des Erdalkalimetall-Kations (Serien 3 – 6). Die möglichen Ursachen für diesen Befund wurden bereits im Zusammenhang mit den Calcium-Analysen diskutiert.

Insgesamt gesehen sind die Resultate der Sr^{2+} -Bestimmungen etwas besser als die der Ca^{2+} -Analysen. Dies hängt eventuell damit zusammen, dass guluronatreiches Alginate über eine höhere Affinität für Strontium- als für Calcium-Ionen verfügt (vgl. Theoretischer Teil, Kapitel 2.6.4.5). Der Austausch der Alginsäure-Protonen durch M^{2+} -Ionen sollte also im Falle von Sr^{2+} vollständiger erfolgen (vgl. Schema 42), wodurch exaktere Bestimmungen möglich sind.

(3) Barium-Bestimmungen

Abschließend werden auf die zuvor beschriebene Weise Ba^{2+} -Analysenproben untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen 39 a) und b) zusammengestellt.

Tab. 39 a): Barium-Bestimmungen – Analysen, Teil 1 (0,00125 – 0,0025 mol Barium-Ionen pro 100 mL Analysen-Lösung) (zur Vorgehensweise vgl. Experiment 31).

Analysenlösung				Alginsäure-Partikel		Ba ²⁺ -Gehalt pro 100-mL-Probe		Ergebnis
Serie	Probe	Konzentrationsbereich	Probengröße	Säule	Überschuss ^a	Praxis	Theorie	Wiederfindung ^b
Nr.	Nr.	c (Ba ²⁺)/mol · L ⁻¹	V/mL	Nr.	H ₂ GG	m/mg	m/mg	%
1	1	0,0125 – 0,0250	20	Ba-10	59-fach	177,56	177,21	100,2
	2			Ba-11	54-fach	177,56	177,21	100,2
	3			Ba-12	66-fach	178,41	177,21	100,7
	4			Ba-13	66-fach	180,13	177,21	101,7
2	1	0,0125 – 0,0250	20	Ba-10	46-fach	225,41	229,09	98,4
	2			Ba-11	43-fach	227,16	229,09	99,2
	3			Ba-12	52-fach	229,74	229,09	99,7
	4			Ba-13	52-fach	232,31	229,09	98,6

^a Bezogen auf die in einer 20-mL-Probe der Analysenlösung theoretisch enthaltene Stoffmenge an Barium-Ionen; zur Berechnung vgl. S. 150.

^b Wiederfindung = $\frac{\text{Praktisch ermittelte Barium-Masse in mg/100 mL} \cdot 100 \%}{\text{Theoretische Barium-Masse in mg/100 mL}}$

Tab. 39 b): Barium-Bestimmungen – Analysen, Teil 2 (0,0025 – 0,00375 mol Barium-Ionen pro 100 mL Analysenlösung) (zur Arbeitsvorschrift vgl. Experiment 31).

Analysenlösung				Säule mit Alginsäure-Partikeln		Ba ²⁺ -Gehalt pro 100-mL-Probe		Ergebnis
Se-rie	Pro-be	Konzentra-tionsbereich	Pro-ben-größe	Typ	Über-schuss ^a	Praxis	Theo-rie	Wieder-findung ^b
Nr.	Nr.	c (Ba ²⁺)/mol · L ⁻¹	V/mL	Nr.	H ₂ GG	m/mg	m/mg	%
3	1	0,0250 – 0,0375	20	Ba-10	33-fach	– ^c	313,73	– ^c
	2			Ba-11	30-fach	318,32	313,73	101,5
	3			Ba-12	37-fach	316,60	313,73	100,9
	4			Ba-13	37-fach	317,40	313,73	101,2
4	1	0,0250 – 0,0375	20	Ba-10	30-fach	351,64	351,11	100,2
	2			Ba-11	27-fach	351,64	351,11	100,2
	3			Ba-12	33-fach	357,65	351,11	101,9
	4			Ba-13	34-fach	– ^c	351,11	– ^c
5	1	0,0250 – 0,0375	20	Ba-10	29-fach	355,62	361,88	98,3
	2			Ba-11	26-fach	359,06	361,88	99,2
	3			Ba-12	32-fach	369,36	361,88	102,1
	4			Ba-13	32-fach	360,78	361,88	99,7
6	1	0,0250 – 0,0375	20	Ba-10	24-fach	446,25	445,65	100,1
	2			Ba-11	21-fach	454,84	445,65	102,1
	3			Ba-12	26-fach	450,54	445,65	101,1
	4			Ba-13	26-fach	453,12	445,65	101,7

^a Bezogen auf die in einer 20-mL-Probe der Analysenlösung theoretisch enthaltene Stoffmenge an Barium-Ionen; zur Berechnung vgl. S. 150.

^b Wiederfindung = $\frac{\text{Praktisch ermittelte Barium-Masse in mg/100 mL} \cdot 100 \%}{\text{Theoretische Barium-Masse in mg/100 mL}}$

^c Fehlbestimmung.

Die statistische Auswertung der Ba²⁺-Analysen führt zu den in Tabelle 40 angegebenen Mittelwerten, Standardabweichungen und Vertrauensbereichen:

Der gemeinsame Mittelwert der Wiederfindungsraten beträgt für die Gesamtheit der Barium-Bestimmungen $\bar{x}_G = 100,24 \%$. Die durchschnittliche gewichtete Standardabweichung berechnet sich zu $s_D = 1,11 \%$. In Abhängigkeit von der gewählten statistischen Sicherheit liegen die Vertrauensbereiche des gemeinsamen Mittelwertes bei $VB_G = \pm 0,49 \%$ ($f = 17$, $P = 95 \%$) bzw. $VB_G = 0,67 \%$ ($f = 17$, $P = 99 \%$).

Tab. 40: Statistische Auswertung der Barium-Analysen.

Analyselösung		Mittelwert ^b der Wiederfindungsraten	Standardabweichung	Vertrauensbereich	
Serie Nr.	Ba ²⁺ -Gehalt pro 100-mL-Probe n/mol			\bar{x}	s_x
				P = 95 %	P = 99 %
1	0,00125 – 0,00250	100,70 %	0,71 %	±1,13 % (f = 3)	±2,07 % (f = 3)
2		98,98%	0,59 %	±0,94 % (f = 3)	±1,72 % (f = 3)
		$\bar{x}_G = 99,84 \%$	$s_D = 0,65 \%$	$VB_G = 0,56 \%$ (f = 6)	$VB_G = 0,85 \%$ (f = 6)
3	0,00250 – 0,00375	101,20 %	0,30 %	±0,75 % (f = 2)	±1,72 % (f = 2)
4		99,73 %	1,04 %	±1,65 % (f = 3)	±3,04 % (f = 3)
5		99,83 %	1,62 %	±2,58 % (f = 3)	±4,73 % (f = 3)
6		101,25 %	0,87 %	±1,38 % (f = 3)	±2,54 % (f = 3)
		$\bar{x}_G = 100,46 \%$	$s_D = 1,30 \%$	$VB_G = \pm 0,74 \%$ (f = 11)	$VB_G = \pm 1,04 \%$ (f = 11)

^a Zur Serienbezeichnung vgl. Tabellen 39 a) und b).

^b Gemäß Gottwald (2000, S. 18) gibt man den Mittelwert gewöhnlich mit einer Nachkommastelle mehr als die Messwerte an.

Differenziert man bei den statistischen Betrachtungen wiederum bezüglich des Barium-Gehaltes der auf die Säule gebrachten Analysenproben, so ist bei den Serien 1 und 2 ($n(\text{Ba}^{2+}) < 0,00250$ mol pro 100 mL Lösung) eine bessere Übereinstimmung mit den theoretischen Werten zu beobachten als bei den höher konzentrierten Bariumchlorid-Lösungen (Serien 3 – 6).

Verglichen mit den Strontium-Bestimmungen findet man bei den Barium-Analysen insgesamt größere Abweichungen von der Theorie, obwohl dies aufgrund der höheren Bindungsaffinität von guluronatreichem Natriumalginat für Ba²⁺ eigentlich nicht zu erwarten wäre. Das Problem bei den Barium-Bestimmungen besteht allerdings darin, dass aufgrund der höheren Molmasse dieses Erdalkalimetalls ($M(\text{Ba}) = 137,327$ g/mol gegenüber $M(\text{Sr}) = 87,62$ g/mol) geringe Ungenauigkeiten in der Arbeitsweise (z. B. beim Ablesen der Titrationsvolumina) größere Abweichungen der praktisch bestimmten Massengehalte nach sich ziehen.

Abschließende Beurteilung der Methode

Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Verfahren zur quantitativen Erdalkalimetallionen-Bestimmung mit Alginsäure im Säulenbetrieb bietet die Möglichkeit, die Ca^{2+} -, Sr^{2+} - bzw. Ba^{2+} -Gehalte von Analysenlösungen in den angegebenen Verfahrensgrenzen auf relativ einfache Weise mit einem selbst hergestellten Kationenaustauscher zu bestimmen.

Wie die im Vorgehenden tabellarisch zusammengefassten Vertrauensbereiche der Mittelwerte zeigen, lassen sich mit dem Verfahren relativ gute Bestimmungsergebnisse erzielen.

Die im Laboralltag übliche Quantifizierung der Genauigkeit der Methode in Form einer Prozentangabe (z. B. wahrer Gehalt $\mu \pm$ maximale Abweichung in %) ist statistisch nicht zulässig, da die Vertrauensbereiche der Mittelwerte nicht nur von der gewählten statistischen Sicherheit ($P = 95$ oder 99 %), sondern auch vom Freiheitsgrad f und somit von der Anzahl der pro Analyse durchgeführten Bestimmungen abhängen.

Als Orientierungshilfe für die Anwendung der Analysenmethode in der Schule und im Praktikumsbetrieb ist aber möglicherweise die Angabe nützlich, dass bei den hier diskutierten 141 Einzelbestimmungen (Versuche zur Reproduzierbarkeit und Analysen) die höchste gefundene individuelle Abweichung vom theoretischen Wert 3,0 % betrug.

Bei etwa 79 % der Calcium- und 97 % der Strontium-Bestimmungen ($N = 48$ bzw. $N = 37$) lagen die Abweichungen vom theoretischen Wert unter 1,5 %. Obwohl die Barium-Bestimmungen insgesamt größere Ungenauigkeiten aufwiesen, wichen hier 44 von 56 Einzelergebnissen (ca. 79 %) weniger als 2 % vom wahren Wert ab.

2.6.5.2 Versuche zur Racemat-Spaltung mit Alginsäure und Calciumalginat

Theoretischer Hintergrund

Racemate können durch Säulenchromatographie mit chiralen Trägern (CT), wie z. B. optisch aktiven Adsorbentien oder Ionenaustauschern, in ihre beiden reinen Enantiomere (+)-E und (-)-E getrennt werden. Dabei nutzt man aus, dass die optischen Antipoden unterschiedlich starke adsorptive oder elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Trägermaterial eingehen. Es resultieren also Diastereomere CT ... (+)-E und CT ... (-)-E, die in ihrer Stabilität differieren. Bei Behandlung der Säule mit einem nicht chiralen Lösungsmittel (Solv.) wird folglich dasjenige Enantiomer besser eluiert, das weniger stark an den Träger gebunden ist. Auf diese Weise kann zumindest eine partielle Racemat-Spaltung bewirkt werden (Elieil 1966, S. 73 f.).

Abbildung 59 veranschaulicht die vorstehenden Erläuterungen schematisch:

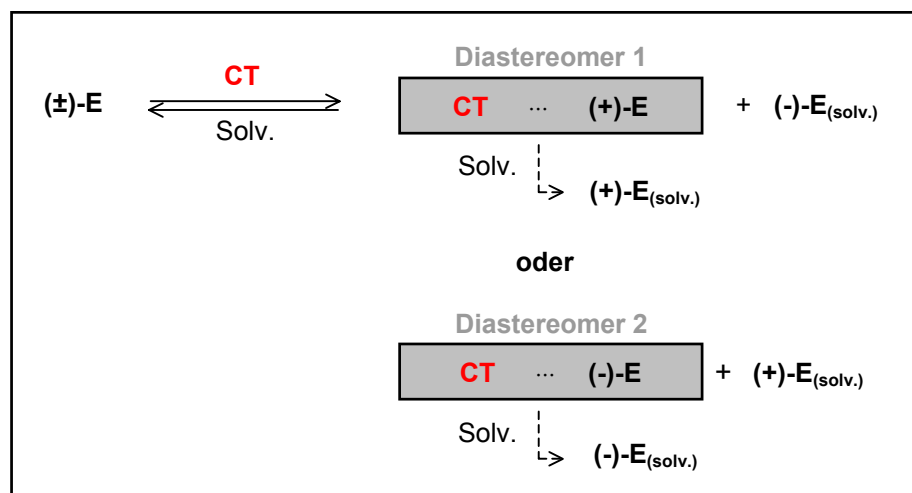


Abb. 59: Prinzip der chromatographischen Racemat-Spaltung mit chiralen Trägern, wie z. B. Adsorbentien oder Ionenaustauschern (verändert nach Elieil 1966, S. 73 f.; Elieil/Wilen 1998, S. 239).

Da es sich bei Alginsäure und Calciumalginat ebenfalls um chirale Substanzen handelt, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob sich diese Algenpolysaccharide für die Enantiomeren-Trennung einsetzen lassen.

Einsatzformen von Alginsäure- und Calciumalginat-Trägern

Für die Versuche zur Racemat-Spaltung werden die in Tabelle 41 aufgelisteten Alginsäure- und Calciumalginat-Materialien verwendet.

Tab. 41: Einsatzformen von chiralen Alginsäure- und Calciumalginat-Trägern für die Racemat-Spaltung.

Träger	Einsatzform	Herstellungsprinzip	Vorgehensweise
Alginsäure	Gelkugeln	Eintropfen von Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 15 - 20 \text{ g/L}$) in Salzsäure ($c = 0,1 - 1 \text{ mol/L}$) <u>Hilfsmittel:</u>	Experiment 32 c)
	groß	Wund- und Blasenspritze (100 mL)	
	klein	20-mL-Spritze mit Kanüle ($d = 0,45 \text{ mm}$, $l = 12 \text{ mm}$):	
	Partikel	Einsieben von festem Natriumalginat in Salzsäure ($c = 1 \text{ mol/L}$)	Experiment 32 a)
	Pulver („Protacid F 120“, Firma FMC BioPolymer)	–	–
Calciumalginat	Gelkugeln	Eintropfen von Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 15 - 20 \text{ g/L}$) in Calciumchlorid-Lösung ($w = 0,10$) <u>Hilfsmittel:</u>	Experiment 32 d)
	groß	s. Alginsäure	
	klein	s. Alginsäure	

Gelkugeln aus Alginsäure und Calciumalginat können auf einfache Weise durch Eintropfen von Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 15 - 20 \text{ g/L}$) in verdünnte Salzsäure bzw. Calciumchlorid-Lösung hergestellt werden. Die Durchmesser der Kugeln lassen sich durch Wahl des verwendeten Hilfsmittels beeinflussen: Mit einer vom Stempel befreiten und mit dem beiliegenden Adapter versehenen Wund- und Blasenspritze entstehen ohne äußere Einwirkung große Gelkugeln ($d = 2 - 4 \text{ mm}$). Verwendet man hingegen eine 20-mL-Spritze mit Kanüle ($d = 0,45 \text{ mm}$, $l = 1,2 \text{ mm}$), so sind die resultierenden Kugeln deutlich kleiner ($d = 1 - 2 \text{ mm}$). Dieser Prozess ist allerdings deutlich aufwändiger, da mit Hilfe des Stempels das gesamte Sol manuell durch die Kanüle gepresst werden muss.

Wie bereits in Kapitel 2.6.5.1 des Theoretischen Teils beschrieben, erfolgt die Herstellung von Alginsäure-Partikeln durch Einsieben von festem Natriumalginat in verdünnte Salzsäure (Chen/Peng 2000, S. 440; verändert). Damit man die erhaltene Alginsäure im Säulenbetrieb einsetzen kann, müssen feine Algenpolysaccharid-Partikel, die die Durchlaufgeschwindigkeit einschränken, auf die in Experiment 31 a) dargelegte Weise abgetrennt werden.

Stabilität von Alginsäure- und Calciumalginat-Trägern gegenüber verschiedenen Elutionsmitteln

Bevor die Alginsäure- und Calciumalginat-Träger für die Versuche zur Racemat-Spaltung eingesetzt werden können, müssen sie zunächst auf ihre Stabilität gegenüber verschiedenen Elutionsmitteln überprüft werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche sind in den Tabellen 41 und 42 zusammengestellt.

(1) Wässriges Milieu

Da Alginsäure und Calciumalginat sowohl in Gelkugel- als auch Partikelform praktisch unlöslich in entionisiertem Wasser sind, lässt sich dieses ohne Probleme als Elutionsmittel verwenden. In verdünnten Säuren weist allerdings nur Alginsäure Stabilität auf, während Calciumalginat unter Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen in die saure Form des Algenpolysaccharids umgewandelt wird. Für den Einsatz im alkalischen Milieu ist jedoch keines der beiden Trägermaterialien geeignet: In Abhängigkeit vom pH-Wert lösen sich Säulenfüllungen aus Alginsäure durch eine Säure-Base-Reaktion mit Hydroxid-Ionen ganz oder teilweise auf. Auch bei Calciumalginat kann bei Einwirkung eines Überschusses an einfach geladenen Kationen (z. B. Na^+) eine partielle Umwandlung des Gels in ein Sol erfolgen. Die damit verbundene Verschleimung der Säulen führt zu stark herabgesetzten Durchlaufgeschwindigkeiten und im Extremfalle zur Verstopfung (vgl. auch Tabelle 42).

Tab. 42: Stabilität von Alginsäure und Calciumalginat gegenüber wässrigen Elutionsmitteln.

Träger	Verwendete Elutionsmittel		
	Entionisiertes Wasser	Verdünnte Säure z. B. $\text{HCl}_{(aq)}$	Lauge z. B. $\text{NaOH}_{(aq)}$
Alginsäure	Stabilität	Stabilität	(Partielle) Auflösung durch Säure-Base-Reaktion
Calciumalginat	Stabilität	Umwandlung in Alginsäure durch Kationenaustauschprozess	(Partielle) Auflösung durch Kationenaustauschvorgang

Für die Racemat-Spaltung lässt sich aus diesen Ergebnissen folgern, dass bei Versuchen zur Auftrennung wasserlöslicher Enantiomeren-Gemische Alginsäure in neutralen und sauren wässrigen Medien einsetzbar ist. Zur Entwicklung von Calciumalginat-Säulen eignet sich hingegen nur entionisiertes Wasser.

(2) Organische Lösungsmittel

Bei Versuchen zum Einsatz von Alginsäure- und Calciumalginat-Gelkugeln in organischen Lösungsmitteln erwies sich schon die Behandlung der Säulen mit Ethanol als problematisch. Das im Algenpolysaccharid-Gel gebundene Wasser löst sich in dem Alkohol, wodurch die Gelkugeln stark schrumpfen. Außerdem kommt es im Rahmen dieses Entwässerungsvorganges zur Freisetzung von Luftblasen aus den Gelkugeln, die in der Säule ein gleichmäßiges Umspülen des Trägermaterials mit dem Elutionsmittel verhindern (vgl. auch Tabelle 43).

Tab. 43: Stabilität von Alginsäure und Calciumalginat gegenüber Ethanol.

Gelkugeln	Waschen der Säule mit Ethanol	Waschen der Säule mit Ethanol nach Vorbehandlung ^a
Alginsäure	Schrumpfung, Luftblasen	Stabilität
Calciumalginat	Schrumpfung, Luftblasen	Stabilität

^a Zur Beschreibung der Methode s. u.

Im Rahmen der Arbeit wurde daher eine Methode entwickelt, mit der sich Alginsäure- und Calciumalginat-Gelkugeln so vorbehandeln lassen, dass sie gegenüber Ethanol Stabilität aufweisen. Dazu werden jeweils 50 g der bis pH = 6 bzw. bis zur Ca²⁺-Freiheit gewaschenen Gelkugeln in 75 mL Ethanol suspendiert und 15 Minuten mittels Magnetrührer gerührt. Nach Abtrennung der Gelkugeln mit Hilfe eines Haushaltsiebes wiederholt man die Behandlung noch dreimal mit frischen 75-mL-Portionen Ethanol.

Die auf diese Weise entwässerten Alginsäure- und Calciumalginat-Kugeln zeigen bei Verwendung in Säulen mit Ethanol als Elutionsmittel keinerlei Veränderungen.

Versuche zur Enantiomeren-Trennung mit Alginsäure und Calciumalginat

Unter Berücksichtigung der in Vorversuchen gewonnenen Erkenntnisse zur Herstellung und Stabilität von Alginsäure- und Calciumalginat-Trägern wurden verschiedene Experimente zur Racemat-Spaltung durchgeführt, die jedoch alle ohne Erfolg blieben. In Tabelle 44 sind die Ergebnisse ausgewählter Versuche im Säulenbetrieb bzw. im Batch-Verfahren zusammengestellt:

Zur Überprüfung des Trennerfolges wird jeweils eine polarimetrische Untersuchung der Eluat-Fractionen (Säule) bzw. der nach bestimmten Zeiten aus dem Gesamtgemisch entnommenen Proben (Batch) durchgeführt.

Um sicherzustellen, dass bei Versuchen im Säulenbetrieb nicht das gesamte Racemat am Trägermaterial gebunden wird, trägt man Proben der Eluat-Fractionen auf DC-Karten mit Fluoreszenz-Indikator auf und untersucht diese im UV-Licht bei $\lambda = 254$ nm. Eine durch den Phenyl-Rest der Substanzen bedingte Fluoreszenz-Löschung zeigt an, dass die Elu-

at-Proben racemathaltig sind. Bei allen in Tabelle 44 beschriebenen Säulenexperimenten verläuft diese einfache Nachweisreaktion mit mehreren Eluat-Fractionen positiv.

Tab. 44: Versuche zur Racemat-Spaltung mit Alginsäure und Calciumalginat in verschiedenen Einsatzformen.

Chiraler Träger	Methode	Racemat	Trennerfolg ^b
Alginsäure Gelkugeln (vorbehandelt mit Ethanol ^a)	Säulenbetrieb	(±)-1-Phenylethanol (Reinsubstanz)	negativ
	Elution mit Ethanol	Nachweisbarkeit im Eluat ^c : +	
Partikel	Säulenbetrieb	(±)-Phenylalanin (salzsaure wässrige Lösung)	negativ
	Elution mit HCl _(aq)	Nachweisbarkeit im Eluat ^c : +	
Partikel	Säulenbetrieb	(±)-α-Aminophenylethansäure (salzsaure wässrige Lösung)	negativ
	Elution mit HCl _(aq)	Nachweisbarkeit im Eluat ^c : +	
Feststoff („Protacid SF 120“, Firma FMC Biopolymer)	Batch-Verfahren	(±)-1-Phenylethanol (Reinsubstanz)	negativ
	–	–	
Calciumalginat Gelkugeln (vorbehandelt mit Ethanol ^a)	Säulenbetrieb	(±)-1-Phenylethanol (Reinsubstanz)	negativ
	Elution mit Ethanol	Nachweisbarkeit im Eluat ^c : +	

^a Zur Beschreibung der Vorbehandlungsmethode vgl. S. 175.

^b Polarimetrische Messung.

^c Fluoreszenz-Löschung im UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) bei Auftragen der Proben auf DC-Karten mit Fluoreszenz-Indikator.

Fazit

Aufgrund der negativen Ergebnisse werden die Versuche zur Racemat-Spaltung mit Alginsäure und Calciumalginat eingestellt. Ein möglicher Grund für das Scheitern der Enantiomeren-Trennung könnte darin bestehen, dass die Algenpolysaccharide aufgrund ihres relativ heterogenen Aufbaus aus α -L-Guluronat- und β -D-Mannuronat-Monomeren nicht einheitlich chiral sind.

2.6.5.3 Versuche zur Trennung und Hydrolyse von Zuckern mit Alginsäure und Calciumalginat im Säulenbetrieb

Überblick

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Entwicklung eines Verfahrens, mit dem sich Säulenfüllungen aus Alginsäure und Calciumalginat auf einfache Weise herstellen lassen (vgl. Kapitel 2.6.5.1 und 2.6.5.2 des Theoretischen Teils). Da sich der Einsatz dieser Algenpolysaccharid-Materialien für die Racemat-Spaltung als nicht praktikabel herausgestellt hat (vgl. Kapitel 2.6.5.2), wurde deren Anwendungsmöglichkeit für andere Trennoperationen in Erwägung gezogen.

Wenn Enantiomeren-Gemische an Alginsäure und Calciumalginat nicht in ihre Komponenten spaltbar sind, liegt es nahe, Mischungen einzusetzen, deren Inhaltsstoffe sich stärker in ihren Eigenschaften unterscheiden. In Versuchsreihen soll daher überprüft werden, ob

- Gemische von Mono- und Disacchariden an Alginsäure- bzw. Calciumalginat-Säulen auftrennbar sind;
- sich Alginsäure-Säulen für die Hydrolyse von Disacchariden mit gleichzeitiger Auftrennung der resultierenden Monosaccharid-Gemische eignen.

Die Ergebnisse der zu diesem Themenkomplex durchgeführten Experimente werden in den folgenden Kapiteln getrennt diskutiert.

Säulenchromatographische Trennung von Mono- und Disacchariden an Alginsäure und Calciumalginat

(1) Prinzip

Für die Trennungsversuche kommen verschiedene Alginsäure- und Calciumalginat-Säulenfüllungen in Partikel- und Gelkugel-Form zum Einsatz. Die Herstellung dieser Materialien erfolgt nach bereits zuvor beschriebenen Prinzipien. Für die Details der Arbeitsweise sei auf die jeweils in Tabelle 45 aufgeführten Versuchsvorschriften verwiesen:

Tab. 45: Herstellung von Alginsäure und Calciumalginat für den Einsatz im Säulenbetrieb.

Säulenfüllung	Form	Herstellungsmethode
Alginsäure	Partikel	Experiment 32 a)
	Gelkugeln	Experiment 32 c)
Calciumalginat	Partikel	Experiment 32 b)
	Gelkugeln	Experiment 32 d)

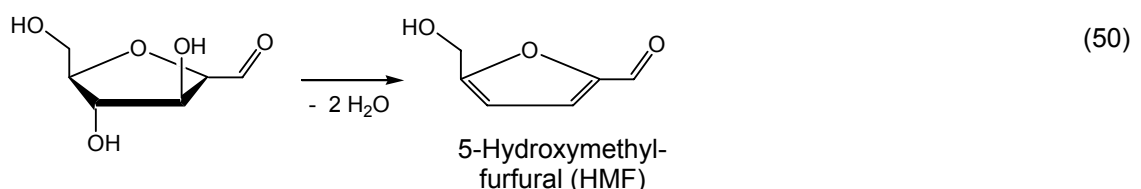
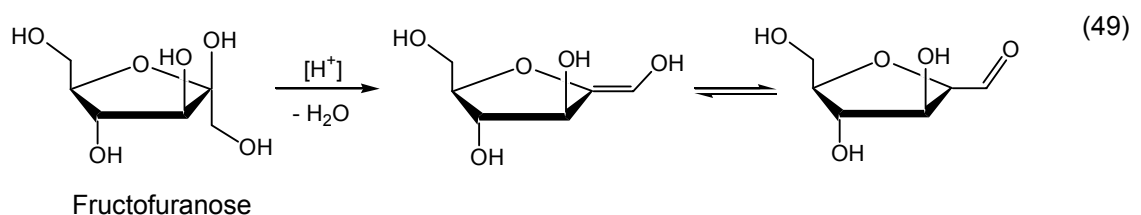
In Analogie zu dem für Alginsäure beschriebenen Verfahren (verändert nach Chen/Peng 2000, S. 440, vgl. Kapitel 2.6.5.1) wird für die Zubereitung von Calciumalginat-Partikeln festes Natriumalginat in Calciumchlorid-Lösung ($c = 1 \text{ mol/L}$) eingesiebt. Nach einer Aushärtezeit von einer Stunde filtriert man die Partikel mittels Schnellauftrichter und Faltenfilter ab und wäscht so lange mit entionisiertem Wasser, bis in der abtropfenden Flüssigkeit mit $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,04$) keine Calcium-Ionen mehr nachweisbar sind. Durch Aufrühren und Dekantieren erfolgt abschließend die Abtrennung der Calciumalginat-Partikel, die aufgrund ihrer geringen Korngrößen nicht als Säulenfüllung einsetzbar sind.

Für die Auftrennungsversuche lässt man auf die verschiedenen Typen von Algenpolysaccharid-Säulen wässrige Zucker-Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung und Konzentration einwirken (vgl. Tabellen 47 und 48) und spült anschließend mit entionisiertem Wasser. Das Eluat wird fraktionsweise in Präparategläsern (30 mL) aufgefangen.

(2) Dünnschichtchromatographische Untersuchung des Eluates

Zum Nachweis der Zucker-Komponenten in den Eluat-Portionen dient ein einfaches dünn-schichtchromatographisches Verfahren (verändert nach Wagner/Sommer 2001, S. 30; vgl. Experiment 34), das nach folgendem Prinzip arbeitet: Auf mit Kieselgel beschichteten Alufolien werden Gemische von Mono- und Disacchariden unter Verwendung eines borsäurehaltigen Fließmittels aufgetrennt. Als Detektionsmittel kommt ein Naphthoresorcin-Schwefelsäure-Reagenz zum Einsatz, mit dem die Zucker in der Hitze unterschiedlich gefärbte Flecke bilden.

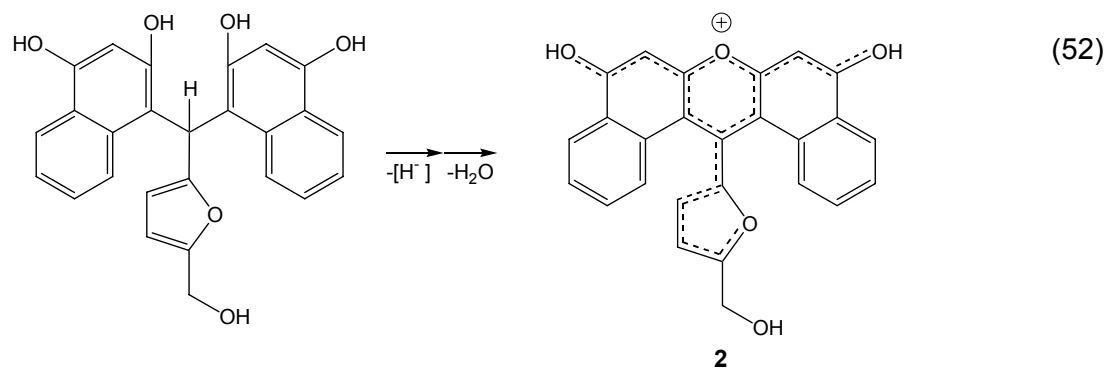
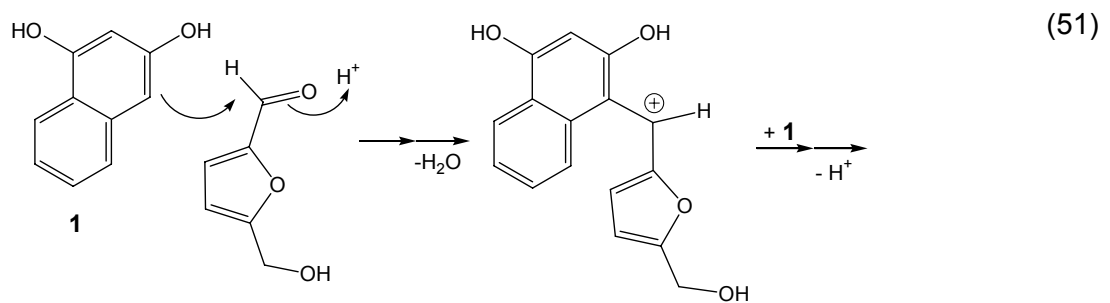
Die mit der Detektion verbundenen chemischen Vorgänge sollen im Folgenden kurz diskutiert werden: Unter katalytischem Einfluss der im Nachweisreagenz vorliegenden Schwefelsäure bildet sich aus den Zuckern zunächst 5-Hydroxymethyl-furfural (HMF). Diese Reaktion erfolgt besonders rasch mit Ketofuranosen, wie z. B. Fructofuranose, läuft aber auch mit anderen Ketosen und Aldopyranosen ab. Die HMF-Bildung wird in den Gleichungen (49) und (50) exemplarisch für Fructofuranose formuliert (Cottier/Descotes 1991; zitiert in Schmidt 1999, S. 50 f.).



Neben der Reaktion unter Erhalt des Furanose-Ringes wird auch eine mechanistische Alternative diskutiert, die über eine offenkettige Zwischenstufe verläuft. Letztere vermag allerdings nicht zu erklären, warum aus Ketofuranosen HMF mit höherer Geschwindigkeit entsteht (Cottier/Descotes 1991; Antal/Mol 1990; zitiert in Schmidt 1999, S. 51).

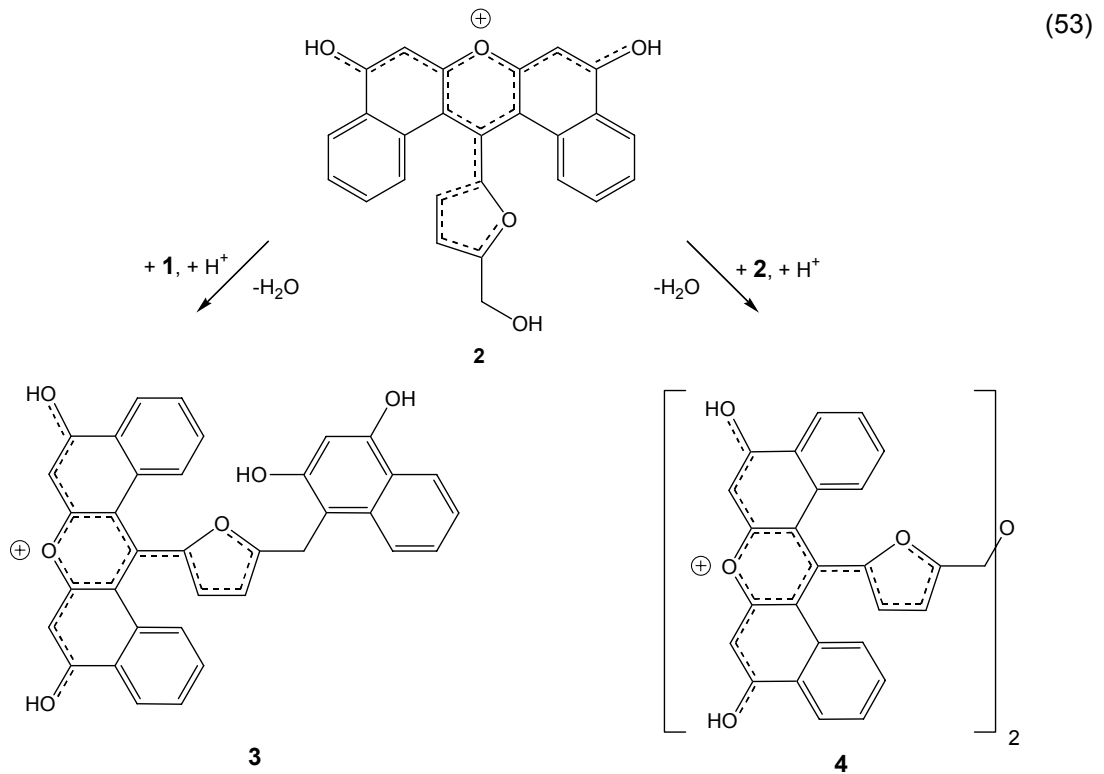
Das aus den Zuckern entstandene 5-Hydroxymethyl-furfural kann im schwefelsauren Nachweisreagenz auf unterschiedliche Weise mit Naphthoresorcin unter Bildung farbiger Substanzen reagieren. Ein Vorschlag für einen Mechanismus wird in den Gleichungen (51) und (52) dargestellt (Schmidt 1999, S. 82. f):

Aus HMF bildet sich zunächst durch Protonierung der Aldehyd-Gruppe ein Elektrophil, das an die 4-Position des Naphthoresorcins (**1**) addiert werden kann. Durch Wasser-Abspaltung entsteht im nächsten Schritt ein Carbenium-Ion, das mit einem weiteren Naphthoresorcin-Molekül zu dem bereits farbigen Produkt **2** umgesetzt wird.



Für das Carbenium-Ion **2** sind die in Gleichung (53) beschriebenen Folgereaktionen denkbar: Zum einen kann es nach Protonierung der Hydroxymethyl-Gruppe elektrophil an ein weiteres Naphthoresorcin-Molekül addiert werden, wobei als Produkt **3** resultiert. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass sich zwei Kationen **2** über eine Ether-Brücke zu der Substanz **4** verknüpfen.

Die unterschiedlichen Färbungen der Zucker-Flecke im Chromatogramm sind dadurch zu erklären, dass im Laufe der Reaktion eine Vielzahl farbiger Spezies entstehen kann (vgl. z. B. **2**, **3** und **4**). Des Weiteren ist anzunehmen, dass beim Erhitzen im schwefelsauren Milieu auch andere Zucker-Abbauprodukte als HMF gebildet werden. Deren Umsetzung mit Naphthoresorcin führt dann zu weiteren Farbstoffvarianten.



Die Ergebnisse der DC-Analyse eines Fructose-Glucose-Saccharose-Gemisches nach dem beschriebenen Verfahren sind in Abbildung 60 dargestellt:

Wie ersichtlich ist, unterscheiden sich die Mono- und Disaccharide nicht nur bezüglich ihrer Laufstrecken, sondern ergeben nach Behandlung mit dem Nachweisreagenz auch verschiedenfarbige Substanzflecken: rot (Fructose), blau (Glucose) und violett (Saccharose).

Obwohl mit dem verwendeten Fließmittel eine akzeptable Trennung der Zucker-Komponenten erreicht werden kann, ist diese insbesondere für Glucose und Saccharose noch nicht optimal, da hier die beiden Substanzflecken ineinander übergehen.

Bei Fructose und Glucose tritt auch beim Auftragen sehr kleiner Substanzmengen Schlep-penbildung auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass diese beiden Monosaccharide der Mutarotation unterliegen, d. h. im Gleichgewicht liegen α - und β -Anomere vor. Im Falle der Fructose ist außerdem zu berücksichtigen, dass nebeneinander Furanose- und Pyranose-Formen existieren. Diese jeweiligen Diastereomere (α , β) und Konstitutionsisomere (Fünf- bzw. Sechsringe) weisen nicht nur Unterschiede in ihren physikalischen Eigenschaften auf, sondern können auch auf verschiedene Weise mit der im Fließmittel enthaltenen Borsäure reagieren (vgl. Abbildung 61).

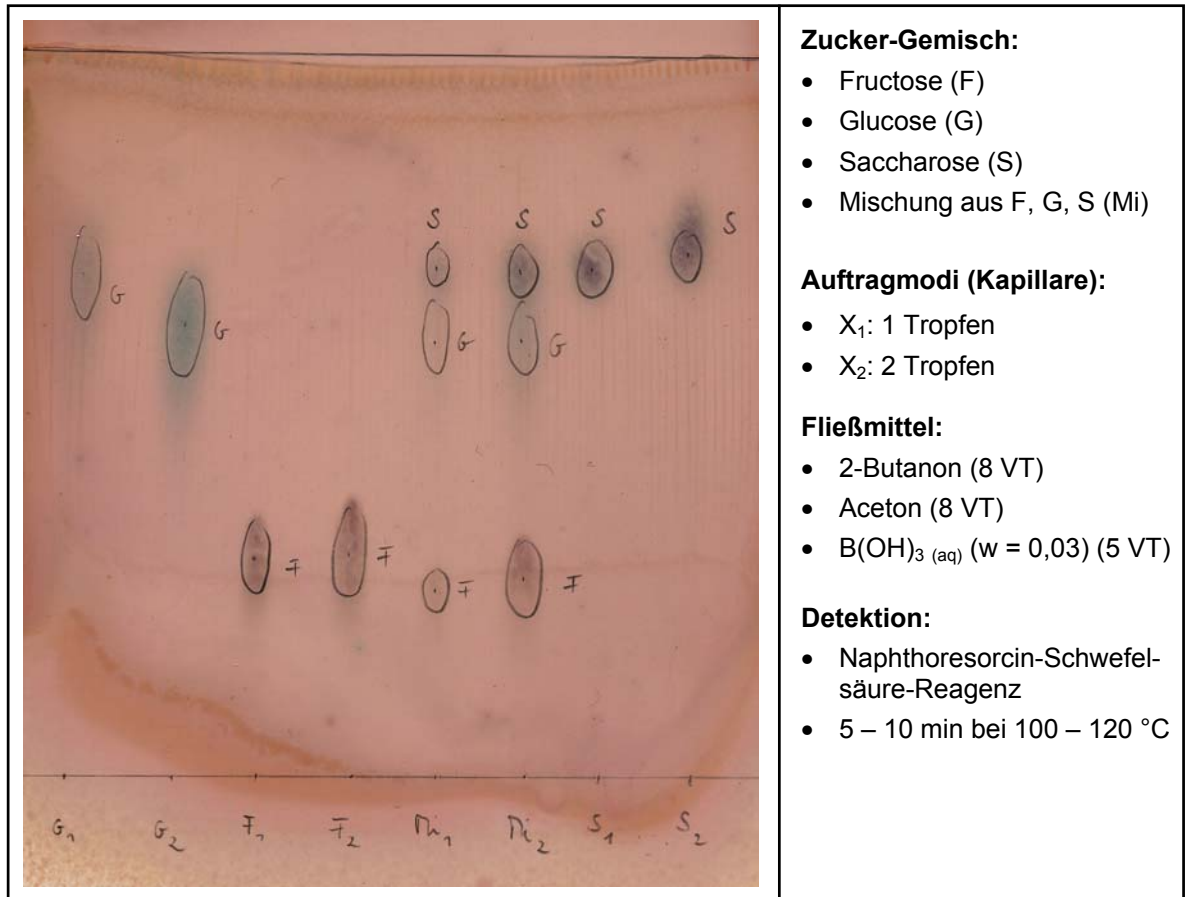


Abb. 60: Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Analyse von Mono- und Disacchariden (Methode nach Wagner/Sommer 2001, S. 30; vgl. Experiment 34).

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass Zucker mit Borsäure unterschiedliche Typen von Komplexen bilden können (vgl. Abbildung 61). Welcher Zucker-Borat-Komplex hauptsächlich vorliegt, hängt vom pH-Wert und den Konzentrationsverhältnissen in der Lösung ab. Die Komplexbildung ist aber generell im alkalischen Milieu begünstigt (Böeseken 1949, S. 189 ff.; Carubelli 1966, S. 480 ff.; Khyrn/Zill 1952, S. 2090 ff.; zitiert in Schmidt 1999, S. 41 f.).

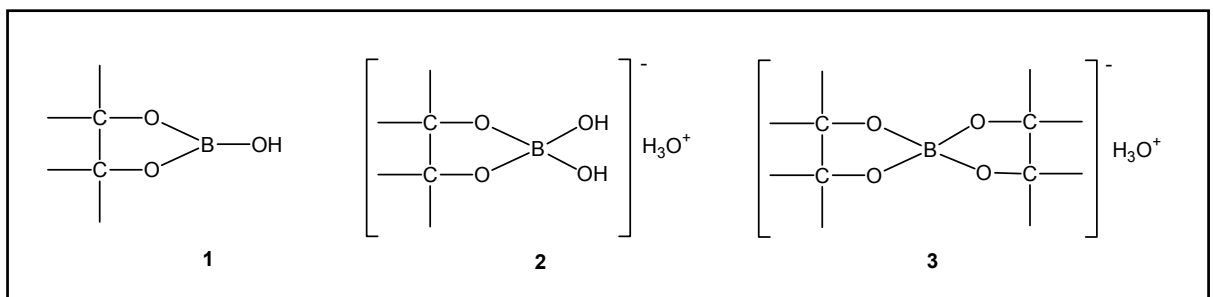


Abb. 61: Verschiedene Typen von Zucker-Borat-Komplexen (Khyrn/Zill 1952, S. 2090 ff.; zitiert in Schmidt 1999, S. 42).

Zur Auswertung der Chromatogramme werden nach Gleichung (54) die Retentionsfaktoren (R_f) für die aufgetragenen Substanzen berechnet:

$$R_f = \frac{\text{Laufstrecke der Substanz (}l_S/\text{cm)}}{\text{Laufstrecke des Fließmittels (}l_{FM}/\text{cm)}} \quad (54)$$

In Tabelle 46 sind die entsprechenden Werte für das Chromatogramm aus Abbildung 60 zusammengestellt.

Tab. 46: Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Analyse eines Gemisches von Fructose, Glucose und Saccharose (vgl. Experiment 34 a)).

Zucker	Laufstrecke der Substanz l_S/cm	Laufstrecke des Fließmittels l_{FM}/cm	Retentionsfaktor R_f
<u>Reinstoffe</u>			
Fructose			
F ₁ (1 Tropfen)	2,9	9,5	0,31
F ₂ (2 Tropfen)	3,0	9,5	0,32
Glucose			
G ₁ (1 Tropfen)	6,6	9,5	0,69
G ₂ (2 Tropfen)	5,95	9,5	0,63
Saccharose			
S ₁ (1 Tropfen)	6,7	9,5	0,71
S ₂ (2 Tropfen)	6,8	9,5	0,72
<u>Mischungen</u>			
Mi ₁ (1 Tropfen)			
Fructose (F _{1, Mi})	2,5	9,5	0,26
Glucose (G _{1, Mi})	5,7	9,5	0,60
Saccharose (S _{1, Mi})	6,7	9,5	0,71
Mi ₂ (2 Tropfen)			
Fructose (F _{2, Mi})	2,65	9,5	0,28
Glucose (G _{2, Mi})	5,7	9,5	0,60
Saccharose (S _{2, Mi})	6,7	9,5	0,71

Wie aus den R_f -Werten für Glucose und Saccharose ersichtlich ist, werden diese Komponenten mit der beschriebenen DC-Methode nicht optimal getrennt. Um die Analysenergebnisse zu verbessern, wurden daher Versuche zur Modifikationen des Verfahrens von Wagner/Sommer (2001, S. 30) durchgeführt.

Die Verfahrensvariationen werden detailliert im Experimentellen Teil beschrieben (vgl. Experiment 34 b). An dieser Stelle soll nur eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse erfolgen:

- Die Auftrennung von Glucose und Saccharose lässt sich nicht verbessern, wenn man bei der Ausgangsmethode die Laufstrecke des Fließmittels erhöht.
- Verschiedene Modifikationen der Fließmittelzusammensetzung führen nicht zu günstigeren Resultaten. Dabei werden Lösungsmittelgemische getestet, die in der Literatur als bewährt für die Trennung von Mono- und Disacchariden beschrieben werden. Aus den Ergebnissen der Variationsversuche wird aber deutlich, dass 2-Butanon und Borsäure entscheidende FM-Komponenten für eine saubere Auftrennung von Fructose, Glucose und Saccharose darstellen.
- Die Rolle der Borsäure für die DC-Analyse der Zucker-Komponenten wird durch Variation des $B(OH)_3$ -Anteils im Ausgangsfließmittel näher untersucht: Die Verringerung der Borsäure-Konzentration bedingt eine schlechtere Auftrennung der Gemische. Andererseits lassen sich auch durch Erhöhung des $B(OH)_3$ -Gehaltes über den ursprünglichen Wert keine größeren Trennerfolge erzielen.

Unter Berücksichtigung dieser Befunde werden alle folgenden DC-Analysen mit dem Ausgangsfließmittel durchgeführt.

(3) *Ergebnisse der Zucker-Trennungen an Alginsäure- und Calciumalginat-Säulen*

Die Resultate von Versuchsreihen zur Trennung von Mono- und Disaccharid-Gemischen an Alginsäure in Partikel- und Gelkugel-Form werden in Tabelle 47 wiedergegeben.

Wie ersichtlich, lassen sich Fructose- und Glucose-Gemische weder mit guluronsäure- noch mit mannuronsäurereichen Alginsäure-Partikeln trennen (vgl. A_{P1} , A_{P2}).

Auch bei Zucker-Lösungen, die ein Mono- und ein Disaccharid (Fructose und Saccharose) enthalten, stellt sich trotz der stärker divergierenden Eigenschaften der beiden Komponenten kein Trennerfolg ein (s. A_{P3}).

Dies gilt ebenso für die Folgeversuche zur Trennung von Fructose und Saccharose mit Alginsäure-Gelkugeln, die aus guluronat- bzw. mannuronatreichem Natriumalginat hergestellt wurden (vgl. A_{GK1} , A_{GK2}). Hier beobachtet man außerdem eine Verteilung jeweils beider Zucker-Komponenten über praktisch alle Eluat-Fractionen.

Auch durch Präparation der Alginsäure-Gelkugeln mit Borsäure (vgl. A_{GK3}), die ja als Fließmittelkomponente für die Separation der Zucker an Kieselgelschichten eine entscheidende Rolle spielt, kann keine Auftrennung von Fructose und Saccharose herbeigeführt werden.

Tab. 47: Versuche zur säulenchromatographischen Zucker-Trennung mit Alginsäure in Partikel- und Gelkugel-Form (A_P bzw. A_{GK}).

An-satz	Alginsäure-Säulen-füllung	Aufzutrennendes Gemisch	Ergebnisse der DC-Analyse ^c (Fraktionen 1 – 10)										Trennerfolg		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
A_{P1}	Partikel (guluron-säurereich)	Fructose ^a Glucose ^a	–	F	F	F	F	F	–	–	–	–	–	–	negativ
A_{P2}	Partikel (mannuron-säurereich)	Fructose ^b Glucose ^b	–	–	F	F	F	–	–	–	–	–	–	–	negativ
A_{P3}	Partikel (guluron-säurereich)	Fructose ^b Saccharose ^b	–	–	F	F	–	–	–	–	–	–	–	–	negativ
A_{GK1}	Gelkugeln (guluron-säurereich)	Fructose ^b Saccharose ^b	–	F	F	F	F	F	F	F	F	F	–	–	negativ
A_{GK2}	Gelkugeln (mannuron-säurereich)	Fructose ^b Saccharose ^b	–	F	F	F	F	F	F	F	F	F	–	–	negativ
A_{GK3}	Gelkugeln (mannuron-säurereich) mit $B(OH)_3$ -Zusatz	Fructose ^b Saccharose ^b	–	F	F	F	F	F	F	–	–	–	–	–	negativ

^a Wässrige Lösung (ρ^* (F, G) = je 50 g/L).

^b Wässrige Lösungen (ρ^* (F, G, S) = je 2,5 – 3 g/L).

^c Hellgraue Schrift symbolisiert schwache Nachweisbarkeit, fettschwarzer Druck eindeutiges Vorliegen der jeweiligen Zucker.

Da die Versuche zur Zucker-Trennung an Alginsäure-Säulen ohne Erfolg blieben, wurde auch noch überprüft, ob sich Calciumalginat in Partikel- oder Gelkugelform eventuell besser für diesen Einsatzzweck eignet.

Tabelle 48 gibt einen Überblick über die dabei erhaltenen experimentellen Ergebnisse:

Wie ersichtlich, sind auch bei Verwendung von Calciumalginat keine klaren Auftrennungen der Mono- und Disaccharide zu verzeichnen.

Zwar ist Ansatz C_{P1} in den Eluaten 6 und 7 Fructose noch leicht positiv nachweisbar, während dies bei Glucose nicht der Fall ist. Dies liegt aber vermutlich darin begründet, dass gerade bei schwach konzentrierten Zucker-Lösungen die Fructose-Flecken aufgrund ihrer intensiven roten Farbe auf entwickelten Chromatogrammen immer etwas deutlicher zu erkennen sind als die blassblauen Glucose-Flecken.

Tab. 48: Versuche zur säulenchromatographischen Zucker-Trennung mit Calciumalginat in Partikel- und Gelkugel-Form (C_P bzw. C_{GK}).

An-satz	Alginsäure-Säulen-füllung	Aufzutren-nendes Gemisch	Ergebnisse der DC-Analyse ^c (Fraktionen 1 – 10)										Trenn-erfolg
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
C_{P1}	Partikel (guluronat-reich)	Fructose ^a	–		F	F	F	F	F	–	–	–	nega-tiv
		Glucose ^a	–		G	G	G	–	–	–	–	–	
C_{GK1}	Gelkugeln (guluronat-reich)	Fructose ^b	–	F	F	F	F	–	–	–	–	–	nega-tiv
		Saccharose ^b	–	S	S	S	S	–	–	–	–	–	

^a Wässrige Lösungen (ρ^* (F, G) = je 50 g/L).

^b Wässrige Lösungen (ρ^* (F, S) = je 2,5 g/L).

^c Hellgraue Schrift symbolisiert schwache Nachweisbarkeit, fettschwarzer Druck eindeutiges Vorliegen der jeweiligen Zucker.

(4) Fazit

Da bei den durchgeführten Versuchsreihen zur Verwendbarkeit von Alginsäure und Calciumalginat als säulenchromatographische Trennmaterialien für Mono- und Disaccharide keine Erfolgsaussichten erkennbar sind, wird dieses Projekt eingestellt.

Säulenchromatographische Hydrolyse von Disacchariden mit Alginsäure

Abschließend soll noch untersucht werden, ob sich Disaccharide im Säulenbetrieb mit Alginsäure hydrolytisch spalten lassen. Dabei kommen bis pH = 6 mit entionisiertem Wasser gewaschene Alginsäure-Partikel zum Einsatz, wie sie sich bereits für die in Kapitel 2.6.5.1 diskutierte quantitative Bestimmung von Erdalkalimetall-Kationen bewährt haben (zur Herstellung und Vorbereitung der Säulenfüllungen vgl. Experiment 32 a) und c).

Die Probenaufgabe und DC-Untersuchung der erhaltenen Eluat-Fractionen erfolgen in Analogie zur säulenchromatographischen Zucker-Trennung.

Die Ergebnisse der Hydrolyse-Experimente mit Saccharose als Testsubstanz finden sich in Tabelle 49.

Tab. 49: Versuche zur säulenchromatographischen Saccharose-Hydrolyse mit Alginsäure-Partikeln (H_{AP}).

An-satz	Säulen-füllung	Eingesetzte Saccharose-Lösung	Ergebnisse der DC-Analyse ^a (Fraktionen 1 – 10)										Hydro-lyse-Erfolg		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
H_{AP1}	Alginsäure-Partikel (guluron-säurereich)	0,300 g Saccharose in 10 mL ent-ionisiertem Wasser	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	nega-tiv
H_{AP2}	Alginsäure-Partikel (guluron-säurereich)	0,300 g Saccharose in 20 mL $CaCl_2$ (aq) (ρ^* (Ca^{2+}) = 10 g/L)	–	–	F	–	–	–	–	–	–	–	–	–	leicht positiv
H_{AP3}	Alginsäure-Partikel (guluron-säurereich)	0,300 g Saccharose in 40 mL $CaCl_2$ (aq) (ρ^* (Ca^{2+}) = 10 g/L)	–	–	F	F	–	–	–	–	–	–	–	–	positiv

^a Hellgraue Schrift symbolisiert schwache Nachweisbarkeit, fettschwarzer Druck eindeutiges Vorliegen der jeweiligen Zucker.

Wie aus den Ergebnissen in Tabelle 47 ersichtlich ist, lässt sich mit unbehandelter Alginsäure keine Spaltung des eingesetzten Disaccharids in Glucose und Fructose herbeiführen (vgl. H_{AP1}). Die Säurestärke der Alginsäure reicht also offensichtlich nicht aus, um Saccharose zu hydrolysieren.

Bringt man jedoch eine Lösung des Disaccharids in $CaCl_2$ (aq) (ρ^* (Ca^{2+}) = 10 g/L) auf die Säule auf, so werden die Protonen der Alginsäure durch Calcium-Ionen ausgetauscht (zur Reaktion s. Teil B, Kapitel 2.6.5.1, Gleichung (31)). Die dabei freigesetzte Salzsäure ist dann in der Lage, Saccharose partiell in ihre Monosaccharid-Bausteine zu spalten. Bei Vergleich der für die Ansätze H_{AP2} und H_{AP3} erhaltenen Ergebnisse ist zudem erkennbar, dass die Hydrolyse umso besser erfolgt, je mehr Calciumchlorid-Lösung auf die Säule gegeben wird. Eine Auftrennung der aus Fructose, Glucose und Saccharose bestehenden Hydrolysate kann jedoch mit Alginsäure nicht herbeigeführt werden. Dies ist ja bereits in den zuvor beschriebenen Versuchen zur säulenchromatographischen Zucker-Trennung deutlich geworden.

Obwohl die erhaltenen Ergebnisse relativ günstig erscheinen, sind bei ihrer Bewertung noch folgende Aspekte zu berücksichtigen:

- Wenn ähnlich gute Hydrolyse-Erfolge durch Einsatz verdünnter Säuren im Batch-Verfahren erzielbar sind, ist die Herstellung und Vorbereitung der Säulenfüllung aus Alginsäure-Partikeln zeitlich und apparativ zu aufwändig, um praktische Anwendung finden zu können. Dies gilt insbesondere aus dem Grund, dass sich Trennungen der Hydrolysat-Komponenten mit Hilfe der Säulen nicht durchführen lassen.
- Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die hydrolytische Spaltung der Saccharose nicht ausschließlich in der Säule stattfindet, sondern eventuell durch die DC-Analyse der säurehaltigen Eluat-Fraktion verstärkt wird. In diesem Zusammenhang gilt es zu bedenken, dass beim Auftragen von Eluat-Proben auf die mit Kieselgel beschichtete Alufolie die Substanz-Flecken jeweils mit einem Heißluftfön getrocknet werden. Dabei herrschen insbesondere in den Fraktionen des Eluats, in denen aufgrund der Freisetzung größerer Salzsäure-Mengen Hydrolyseerfolge zu verzeichnen sind, pH-Bedingungen vor, die ein Fortschreiten der Zucker-Spaltung in der Hitze wahrscheinlich machen.

Zur Aufklärung der geschilderten Problematik werden Versuche zur Hydrolyse von Saccharose mit verdünnter Salzsäure im Batch-Verfahren durchgeführt.

Zunächst erfolgt in zwei Reaktionsansätzen die Umsetzung von je 0,300 g Saccharose mit 40 mL Salzsäure der Konzentrationen $c = 0,1 \text{ mol/L}$ bzw. 1 mol/L (vgl. Experiment 33 a)). Nach 30, 60, 90 und 120 Minuten entnimmt man beiden Mischungen Proben und trägt diese mit Hilfe einer Glaskapillare auf eine mit Kieselgel beschichtete Alufolie auf und fönt sofort trocken, damit die Reaktion abgestoppt wird. Die dünnschichtchromatographische Analyse wird dann gemäß der Arbeitsvorschrift in Experiment 33 a) durchgeführt.

Die Ergebnisse der DC-Analyse der Hydrolysate sind Abbildung 62 zu entnehmen:

Bei einer Salzsäure-Konzentration von $c = 0,1 \text{ mol/L}$ wird Saccharose schon nach einer Reaktionszeit von 30 min partiell hydrolysiert. Nach 60, 90 und 120 min sind im Reaktionsgemisch immer noch Edukt und Produkte nebeneinander nachweisbar.

Durch Erhöhung der Salzsäure-Konzentration auf $c = 1 \text{ mol/L}$ kann die Umsatzgeschwindigkeit beträchtlich gesteigert werden: Bereits nach einer Reaktionszeit von 30 min lassen sich in einer Probe des Reaktionsansatzes nur noch Fructose und Glucose nachweisen. Die vorgelegte Saccharose wurde also vollständig in ihre Monosaccharid-Bausteine aufgespalten. Die für die aufgetragenen Substanzen berechneten R_f -Werte sind dem Experimentellen Teil zu entnehmen.

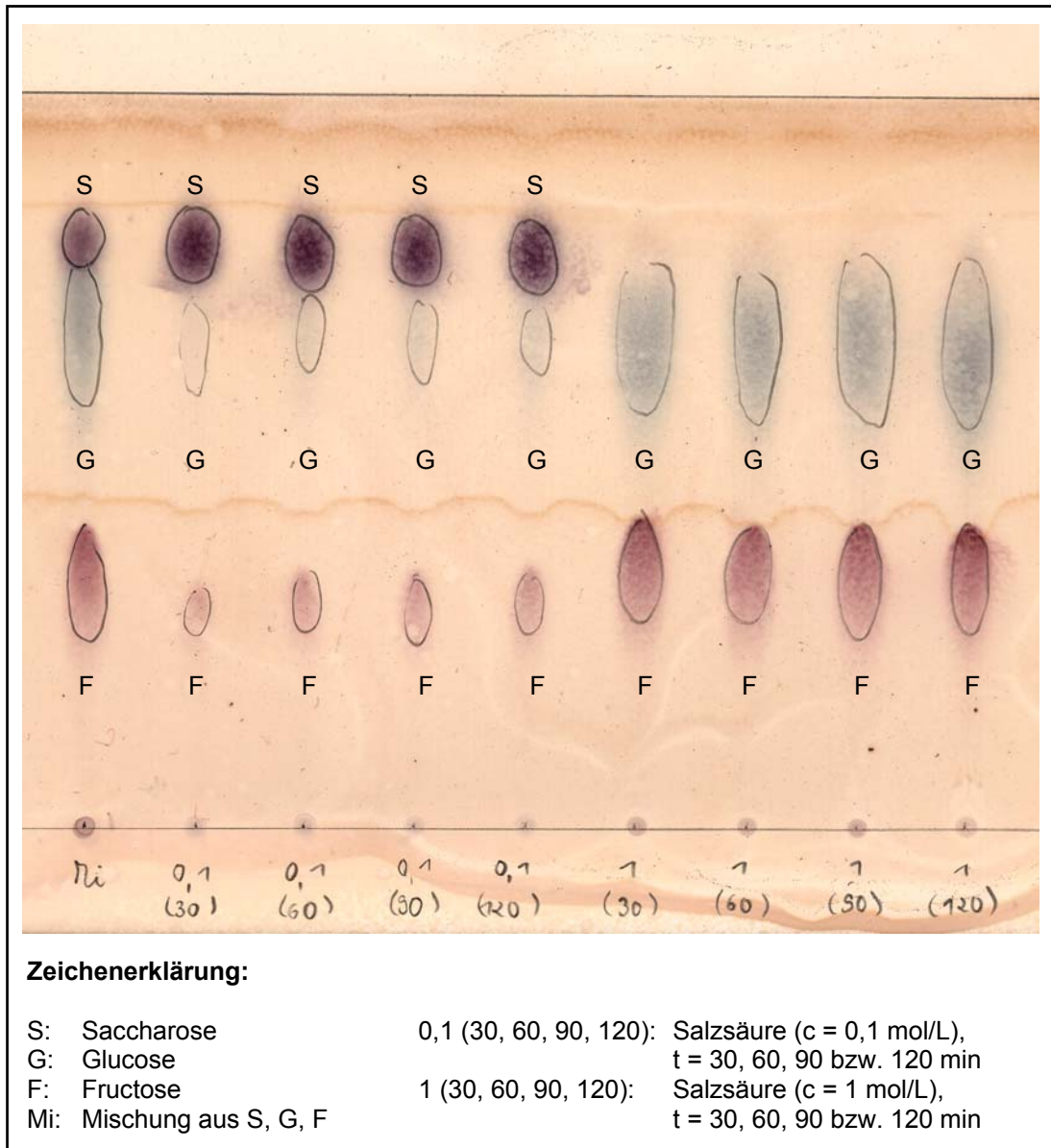


Abb. 62: Hydrolyse von Saccharose mit verdünnter Salzsäure im Batch-Verfahren: DC-Analyse der nicht neutralisierten Hydrolysate (Experiment 33 a)).

Um sicherzustellen, dass die Saccharose-Hydrolyse nicht durch die hohen Temperaturen beim Föhnen des sauren Reaktionsgemisches auf der DC-Karte vorangetrieben wird, sollen zwei Reaktionsansätze mit Salzsäure (c = 0,1 bzw. 1 mol/L) untersucht werden, in denen man die Proben vor ihrer Auftragung mit einem Überschuss an festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert (vgl. Experiment 33 b)).

Diese Vorgehensweise liefert allerdings keine akzeptablen Ergebnisse, da die einzelnen Zucker auf dem Chromatogramm nicht eindeutig identifizierbar sind. Grund dafür ist, dass die Substanz-Flecken durch die hohen NaHCO_3 -Konzentrationen extrem lang gezogen sind und praktisch ineinander übergehen (vgl. auch Experimenteller Teil, Kapitel 2.1.4.4).

In einer Versuchsvariante (vgl. Experiment 33 c)) wird daher eine veränderte Form der Hydrolysat-Neutralisierung durchgeführt. Aus zwei Ansätzen mit Gemischen aus 0,300 g Saccharose und 40 mL Salzsäure ($c = 0,1$ mol/L bzw. 1 mol/L) entnimmt nach 30, 60, 90 und 120 Minuten 1-mL-Proben und lässt diese jeweils zum Abstoppen der Reaktion in 1,5 mL Natriumhydrogencarbonat-Lösung ($c = 0,1$ mol/L bzw. 1 mol/L) einfließen. Die neutralisierten Hydrolysate werden dann mit Glaskapillaren auf eine DC-Karte aufgetragen und nach der Methode von Wagner/Sommer (2001, S. 30) analysiert.

Gegenüber den nicht neutralisierten Ansätzen (Experiment 33 a), Abbildung 62) zeigen sich hier deutlich veränderte Ergebnisse (vgl. Abbildung 63):

Im Reaktionsansatz mit Salzsäure ($c = 0,1$ mol/L) sind in allen Proben klar begrenzte Saccharose-Flecken zu erkennen. Erste Anzeichen für die hydrolytische Spaltung des Disaccharides sind erst nach 60, 90 und 120 Minuten Reaktionszeit sichtbar. Hier zeigen sich sehr schwache Fructose-Flecken.

In der Reaktionsmischung mit Salzsäure ($c = 1$ mol/L) ist die Hydrolyse deutlich weiter fortgeschritten als im ersten Ansatz. Nach dreißigminütiger Reaktionszeit beobachtet man zwar erst einen schwachen Fructose-Fleck im Chromatogramm, aber nach 60, 90 und 120 Minuten liegt das Monosaccharid in deutlich höheren Konzentrationen vor.

Die Glucose- und Saccharose-Flecken sind jedoch räumlich und farblich nicht klar separiert, was vermutlich wiederum auf das Verschmieren der Banden durch hohe Natriumhydrogencarbonat-Gehalte zurückzuführen ist.

Nichtsdestotrotz wird jedoch deutlich, dass mit einer Salzsäure-Konzentration von $c = 1$ mol/L bei Reaktionszeiten von 60 – 120 Minuten bereits ein beträchtlicher Anteil der vorgelegten Saccharose in Glucose und Fructose gespalten wird.

Auch bei Einsatz von Alginsäure-Säulen (vgl. Tabelle 49) erreicht man keine vollständige Hydrolyse des Disaccharids. Zu berücksichtigen ist hier außerdem, dass die untersuchten Proben vor ihrer dünnschichtchromatographischen Untersuchung nicht neutralisiert wurden. Die tatsächlichen Umsatzraten sind also noch geringer als die experimentell gefundenen.

Da sich zudem die Trennung von Fructose, Glucose und Saccharose an Alginsäure-Säulen als nicht realisierbar herausgestellt hat, scheint es angebracht, die Versuche zur Zucker-Hydrolyse einzustellen, weil keine erkennbaren Erfolgsaussichten bestehen.

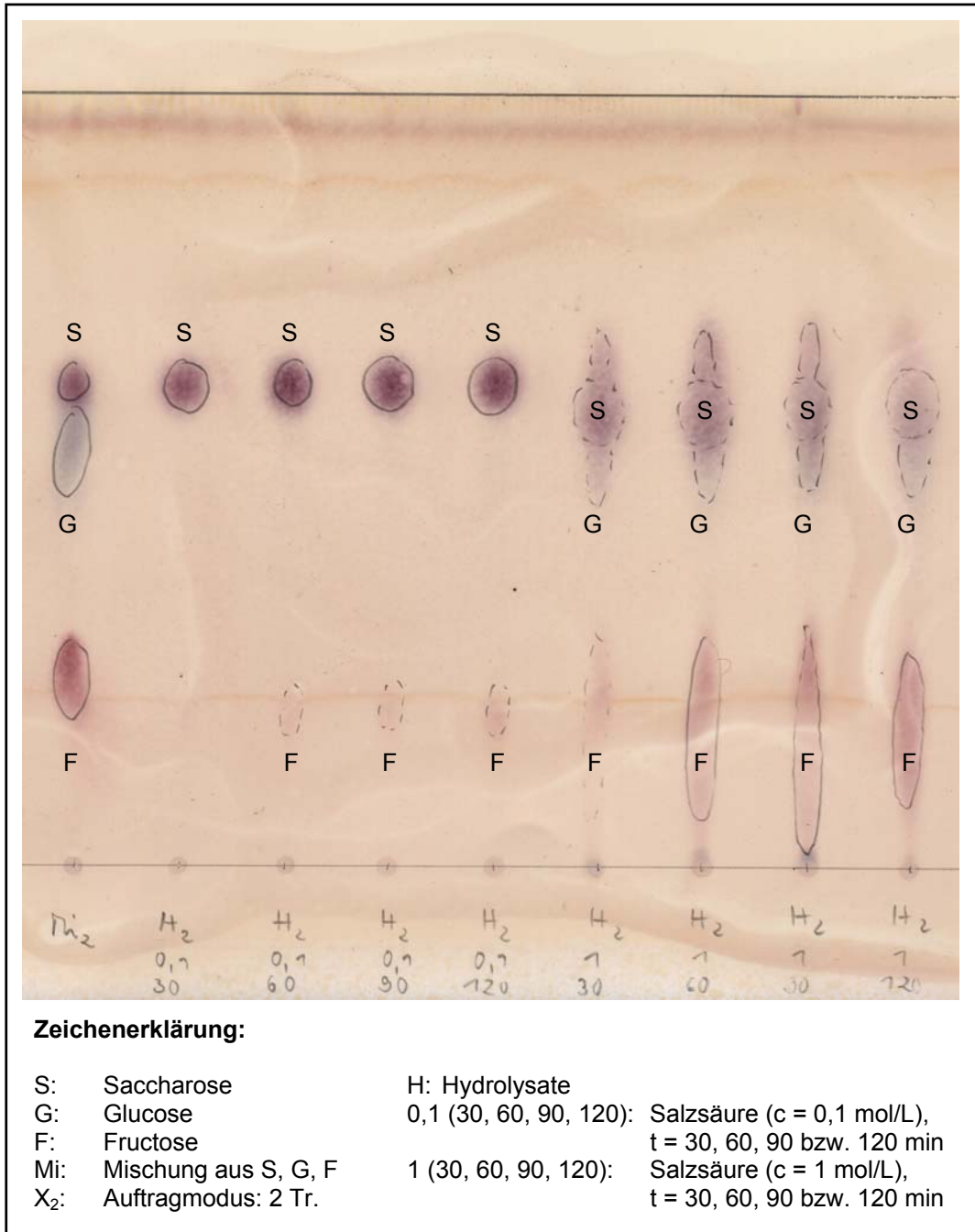


Abb. 63: Hydrolyse von Saccharose mit verdünnter Salzsäure im Batch-Verfahren: DC-Analyse der mit Natriumcarbonat-Lösung neutralisierten Hydrolysate (vgl. Experiment 33 c)).

3 Carrageenane

3.1 Historische Aspekte und heutige Bedeutung

In Irland wird die carrageenanhaltige Rotalge *Chondrus crispus* (engl. „Irish moss“) in von der Sonne getrockneter und zerkleinerter Form schon seit mehr als 600 Jahren in der Heilkunde sowie für die Herstellung von Nahrungsmitteln, wie z. B. gelartigen Milchspeisen (engl. „blancmange“), verwandt (Baird 1994, S. 847; Firma Systems Bio-Industries 1987, S. 26; Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 218).

Es wird gemeinhin angenommen, dass auch die Bezeichnung „Carrageenan“ irischer Herkunft ist:

- Ein etymologischer Ansatz besagt, dass sich dieses Wort von dem Namen eines in Irland gelegenen Küstenortes ableitet (Voragen/Pilnik 1994, S. 40). Für diese These finden Mitchell/Guiry (1983; zitiert in Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 219) in ihren Untersuchungen allerdings keine Bestätigung.
- Alternativ wird diskutiert, dass der Begriff „Carrageenan“ seinen Ursprung in dem aus dem Irischen stammenden Ausdruck „cosaínín carraige“ habe, der wörtlich ins Deutsche übersetzt „kleiner Stiel vom Felsen“ bedeutet (Allen 1990, S. 171) oder auf das irische Etymon „carraigeen“ (dt. Felsmoos) zurückgehe (Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 219).

Mit der Ansiedlung von irischen Einwanderern in den USA und Kanada zu Beginn des 19. Jahrhunderts nahm auch die Nutzung der in den dortigen Küstenregionen vorkommenden Rotalgen mit Carrageenan-Gehalt ihren Anfang (Voragen/Pilnik 1994, S. 40).

Ein Verfahren zur Extraktion und anschließenden Reinigung des Algenpolysaccharids wurde in den Vereinigten Staaten bereits im Jahre 1871 patentiert (Bourgade 1871; zitiert in Baird 1994, S. 849). Die kommerzielle Gewinnung von Carrageenan aus Rotalgen begann in den USA jedoch erst um 1940 (Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 219).

Eine Ursache für die Entstehung der Carrageenan-Industrie wird darin gesehen, dass während des Zweiten Weltkrieges in der westlichen Welt ein Engpass in der Versorgung mit Agar entstand, weil Lieferungen des Hauptproduktionslandes Japan entfielen. Im Kontext der Suche nach alternativ einsetzbaren Algenpolysacchariden bemühte man sich verstärkt, die Verfahren zur Extraktion von Carrageenan aus Rotalgen zu verbessern (Pedersen 1980, S. 114; Percival/McDowell 1990, S. 538).

Einen weiteren Anstoß für die Ausweitung der kommerziellen Produktion von Carrageenan lieferte die milchverarbeitende Industrie in den USA, wo in den vierziger Jahren die Eignung dieses Algenpolysaccharids für die Stabilisierung von Kakaotränken entdeckt wurde (Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 219).

Heutzutage werden weltweit etwa 30.000 Tonnen Carrageenan pro Jahr gewonnen (Marinalg 2003 b). Zu den Hauptproduzenten des Algenpolysaccharids zählen Firmen in den USA, Dänemark und Frankreich. Kleinere carrageenangewinnende Betriebe finden sich auch in Spanien, Südkorea, Japan sowie auf den Philippinen (Voragen/Pilnik 1994, S. 44).

3.2 Chemischer Aufbau und Struktur

3.2.1 Theoretischer Hintergrund

Mit dem Begriff „Carrageenan“ bezeichnet man die Familie der Salze von heterogen aufgebauten linearen Galactanen, deren monomere Galactose-Bausteine partiell sulfatiert sind und/oder in Form von Anhydrogalactose-Resten vorliegen. Als Gegenionen finden sich im nativen Zustand vorwiegend Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} - und NH_4^+ -Ionen (Glicksman 1983 b, S. 84).

Schematisch kann man Carrageenane als alternierende Copolymere vom Typ $(\text{AB})_n$ charakterisieren (Clark/Ross-Murphy 1987, S. 115): Während der Baustein A ein β -D-Galactose-Derivat darstellt, handelt es sich bei B um einen Abkömmling der α -D-Galactose. A und B sind abwechselnd β -1,4- und α -1,3-glykosidisch verknüpft (vgl. Abbildung 64).

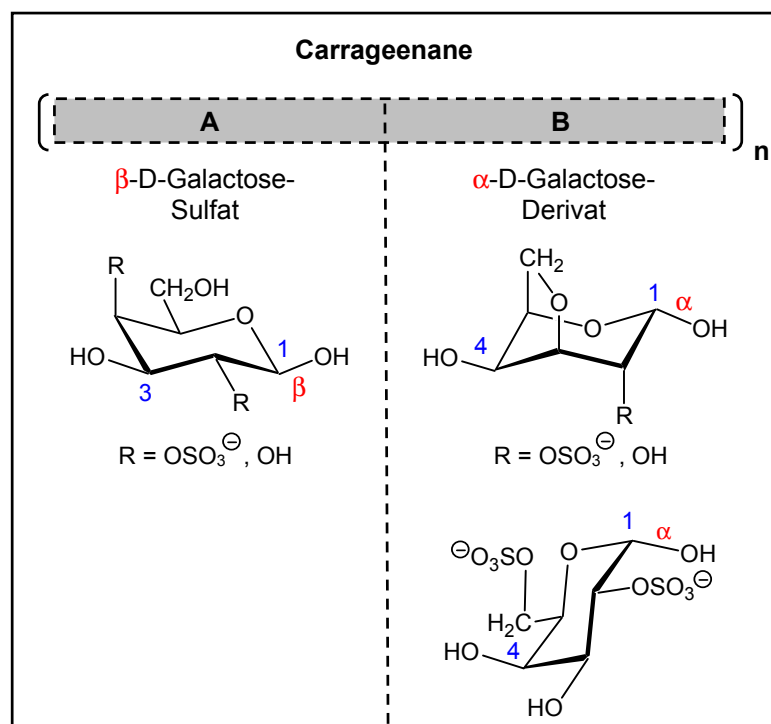


Abb. 64: Monomere Bausteine der Carrageenane (Clark/Ross-Murphy 1987, S. 115).

Für den kommerziellen Bedarf aus Rotalgen gewonnene Carrageenane lassen sich drei idealisierten Haupttypen zuordnen, die mit den griechischen Buchstaben κ , ι , und λ bezeichnet werden. Die Molekülmassen dieser Algenpolysaccharide liegen im Bereich von etwa 100.000 – 1.000.000 u (Baird 1994, S. 849), was durchschnittlichen Polymerisationsgraden von $n \approx 400 - 4.000$ entspricht.

Daneben existieren sogenannte β -, γ -, μ -, ν -, ξ - und θ -Varianten (Stanley 1990, S. 80 f.), welche aber im Rahmen dieser Arbeit aufgrund ihrer untergeordneten wirtschaftlichen Bedeutung nicht näher betrachtet werden sollen.

Abbildung 65 gibt einen Überblick über die chemische Zusammensetzung und Struktur der drei wichtigsten Carrageenan-Typen:

κ -Carrageenan besteht aus dimeren Grundeinheiten, in denen jeweils β -D-Galactose-4-sulfat (Baustein A) 1,4-glykosidisch an α -D-3,6-Anhydrogalactose (Baustein B) gebunden ist. Die derart aufgebauten Dimere werden auch als Carrabiose bezeichnet und sind in der dem Polymerisationsgrad entsprechenden Anzahl untereinander 1,3-glykosidisch zu einem Kettenmolekül verknüpft.

ι -Carrageenan unterscheidet sich nur dahingehend von κ -Carrageenan, dass bei ersterem die α -D-3,6-Anhydrogalactose-Einheit in C-2-Position eine zusätzliche Sulfat-Gruppe trägt.

Der als λ -Carrageenan bezeichnete dritte Typ hingegen setzt sich aus dimeren Grundeinheiten zusammen, in denen – abweichend von der für κ - und ι -Carrageenan beschriebenen Situation – der α -D-3,6-Anhydrogalactose-Baustein gänzlich fehlt. λ -Carrageenan stellt vielmehr ein alternierendes Copolymer aus β -D-Galactose-2-sulfat- und α -D-Galactose-2,6-disulfat-Resten dar.

Die Polymereigenschaften von Carrageenanen werden entscheidend durch die Ringkonformationen der monomeren Galactosederivat-Reste im Kettenmolekül bestimmt. Diesbezüglich weisen κ - und ι -Carrageenan gegenüber der λ -Variante einen fundamentalen Unterschied auf: Aufgrund der Tatsache, dass im κ -Carrageenan β -D-Galactose-4-sulfat in der 4C_1 -Konformation vorliegt, während der α -D-3,6-Anhydrogalactose-Baustein 1C_4 -Konformation einnimmt, sind alle glykosidischen Verknüpfungen diäquatorialer Natur. Letzteres gilt ebenso für die Glykosid-Bindungen im ι -Carrageenan, welches – wie im Vorangehenden diskutiert – lediglich über einen höheren Sulfatierungsgrad verfügt als der κ -Typ.

Im Falle des λ -Carrageenans nimmt zwar das β -D-Galactose-2-sulfat analog zur Situation in der κ - und ι -Variante 4C_1 -Konformation ein, aber das α -D-Galactose-2,6-disulfat, welches im λ -Typ anstelle der α -D-3,6-Anhydrogalactose als Baustein B vorzufinden ist, liegt nicht in 1C_4 -, sondern ebenfalls in der 4C_1 -Konformation vor.

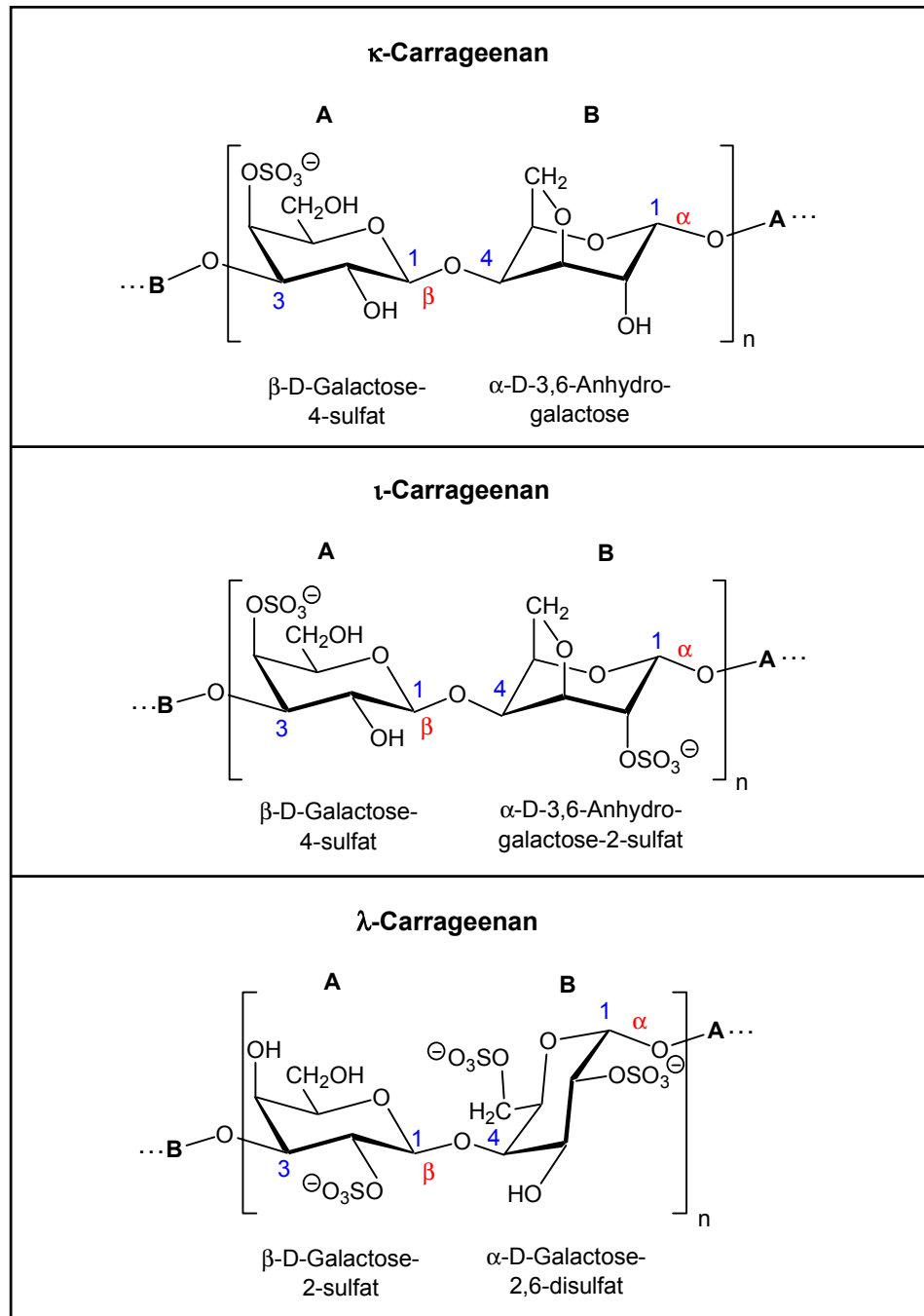


Abb. 65: Kommerziell relevante Carrageenan-Typen (A, B: vgl. Abbildung 64) (Pedersen 1980, S. 117; Voragen/Pilnik 1994, S. 41).

Dies hat zur Folge, dass im λ-Carrageenan die 1,4-glykosidischen Verknüpfungen innerhalb der sich wiederholenden dimeren Basiseinheiten äquatorial-axial und die 1,3-Glykosid-Bindungen zwischen diesen Dimeren axial-äquatorial sind. Wie an späterer Stelle noch erläutert wird, hat der aufgezeigte Unterschied in der Art der glykosidischen Verknüpfung einen entscheidenden Einfluss auf die Gelbildungseigenschaften der verschiedenen Carrageenan-Typen (vgl. Kapitel 3.3.2 des Theoretischen Teils).

Die exakte Zusammensetzung der industriell aus Rhodophyta gewonnenen Carrageenane ist in starkem Maße abhängig von der als Rohstoff eingesetzten Algenart. Tabelle 50 veranschaulicht exemplarisch, dass native Carrageenane in ihrem chemischen Aufbau häufig nicht den zuvor beschriebenen Idealtypen entsprechen, sondern Gemische zweier oder mehrerer Varianten darstellen:

Tab. 50: Zusammensetzung nativer Carrageenane (Stanley 1990, S. 84; Voragen/Pilnik 1994, S. 35; verändert); Hauptkomponenten sind durch Unterstreichung gekennzeichnet.

Ausgewählte Rotalgen-Arten	Enthaltene Carrageenan-Typen
<i>Chondrus ocellatus</i>	λ , κ
<i>Chondrus crispus</i>	<u>λ</u> , <u>κ</u> , ι
<i>Gigartina radula</i>	<u>λ</u> , κ
<i>Gigartina stellata</i>	<u>λ</u> , κ
<i>Gigartina acicularis</i>	λ
<i>Euचेuma cottonii</i>	κ
<i>Euचेuma spinosum</i>	ι

Anhand der drei letztgenannten Beispiele wird allerdings deutlich, dass auch einige Rotalgen-Arten existieren, welche nahezu ausschließlich Carrageenane eines bestimmten Typs enthalten.

Als weitere Einflussfaktoren auf die Carrageenan-Zusammensetzung sind nach Voragen/Pilnik (1994, S. 40) der morphologische Herkunftsbereich des Polysaccharids innerhalb der Rotalge, deren geographisches Vorkommen sowie die Erntezeit und die Extraktionsmethode zu nennen.

3.2.2 Carrageenane als typische Polysaccharid-Vertreter

Carrageenane weisen – ebenso wie Alginat – als Polysaccharid-Derivate keine reduzierenden Eigenschaften auf. Unterzieht man jedoch die Rotalgenpolysaccharide einer sauren Hydrolyse, so lassen sich im Reaktionsgemisch mit experimentellen Methoden, wie z. B. der Fehling-Probe, reduzierende Zucker nachweisen. Dies wird durch Experiment 36 veranschaulicht.

Die chemischen Hintergründe der Fehling-Reaktion und die damit im Zusammenhang stehende mechanistische Problematik wurden bereits in Kapitel 2.2.2 des Theoretischen Teils eingehend diskutiert.

3.3 Charakteristische Eigenschaften

3.3.1 Lösungsverhalten

3.3.1.1 Allgemeine Aspekte

Carrageenane verfügen über die für hydrophile Kolloide typischen Solvatationseigenschaften: Sie lösen sich weder in unpolaren organischen Lösungsmitteln noch in hochkonzentrierten Alkoholen und Ketonen, die selbst Mischbarkeit mit Wasser aufweisen (Firma Copenhagen Pectin 1996 a, S. 6). In wässrigen Systemen hingegen bilden diese Algenpolysaccharide hochviskose kolloidale Lösungen (vgl. auch Teil B, Kapitel 3.3.1.3). Die Ursachen für die hohen Fließwiderstände dieser Sole sind vor allem in der linearen makromolekularen Struktur sowie im Polyelektrolyt-Charakter der Carrageenane zu sehen (Stanley 1990, S. 87 f.).

Aufgrund ihres voneinander abweichenden chemischen Aufbaus weisen die drei kommerziell relevanten Carrageenan-Typen κ , ι und λ Unterschiede im Lösungsverhalten auf. Zu den Faktoren, die einen Einfluss auf die Löslichkeit dieser Algenpolysaccharide in Wasser ausüben, zählen vor allem deren α -D-3,6-Anhydrogalactose-Gehalt und Sulfatierungsgrad. Diesbezügliche Angaben sind Tabelle 51 zu entnehmen:

Tab. 51: Prozentuale α -D-3,6-Anhydrogalactose- und Sulfat-Gehalte der drei Carrageenan-Typen von industrieller Bedeutung (Glicksmann 1983 a, S. 70; Glicksmann 1987, S. 41; verändert).

Carrageenan-Typ	α -D-3,6-Anhydrogalactose-Gehalt in %	Sulfat-Gehalt in %
κ	28 – 35	25 – 30
ι	30	28 – 35
λ	0	32 – 39

Wegen der Präsenz von α -D-3,6-Anhydrogalactose sind κ - und ι -Carrageenane tendenziell hydrophober als die λ -Variante. Zudem bewirkt der im Vergleich zum κ - und ι -Typ höhere Sulfat-Gehalt des λ -Carrageenans eine Verstärkung dessen hydrophilen Charakters (Pedersen 1980, S. 116).

Die Löslichkeit der drei Carrageenan-Typen wird außerdem durch die Art der vorliegenden Gegenionen beeinflusst: Während alle Salze der λ -Variante bereits in kaltem Wasser vollständig löslich sind, trifft dies im Falle des κ - und ι -Carrageenans nur für die Natriumverbindungen zu. Bei den Kalium- und Calciumsalzen der beiden letztgenannten Carrageenane ist in kaltem Wasser lediglich ein Aufquellen zu beobachten (Stanley 1990, S. 88).

Da in handelsüblichen Carrageenan-Produkten die sulfatierten Galactane in Verbindung mit einem Gemisch von Gegenionen vorliegen – in der Regel hauptsächlich Na^+ , K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} (vgl. z. B. Firma Copenhagen Pectin 1996 b, c, d) – macht man sich bei der Herstellung von Solen dieser Algenpolysaccharide die Tatsache zunutze, dass alle Carrageenan-Typen unabhängig von den im Salz vorhandenen Kationen in heißem Wasser bei Temperaturen oberhalb von 70 – 75 °C in Lösung gehen (Stanley 1990, S. 88; Vora-gen/Pilnik 1994 b, S. 43).

3.3.1.2 Herstellung von Carrageenan-Lösungen

Beim Ansetzen von wässrigen Carrageenan-Solen sind einige experimentelle Besonderheiten zu beachten, auf die im Rahmen dieses Kapitels näher eingegangen werden soll: Bringt man pulverisierte Carrageenane in entionisiertes Wasser ein, so nehmen diese aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften das Solvens sehr schnell auf. Die daraus resultierende Umhüllung von Carrageenan-Partikeln mit einer viskosen Schicht des sich bildenden Polysaccharid-Sols kann zu Klumpenbildung führen, wodurch die vollständige Auflösung des Carrageenans stark behindert wird (Stanley 1990, S. 88).

Besonders wichtig für die Solvatisierung von Carrageenanen ist folglich eine effiziente Dispersion der Algenpolysaccharid-Partikel im Lösungsmittel. Dazu bieten sich nach Stanley (1990, S. 88) verschiedenartige Methoden an, von denen die unter Laborbedingungen zeitlich und gerätetechnisch am ökonomischsten zu realisierende in Experiment 37 a) dieser Arbeit vorgestellt wird:

Die für die Herstellung eines Sols der gewünschten Konzentration erforderliche Menge des Carrageenans wird zunächst unter intensivem Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch in dem jeweils benötigten Volumen an entionisiertem Wasser suspendiert. Diese Operation ist umso einfacher auszuführen, je schlechter sich die eingesetzte Carrageenan-Art im Solvens löst: So lassen sich beispielsweise K^+ - und Ca^{2+} -haltige κ - und ι -Carrageenane unter weitaus geringerer Klumpenbildung in kaltem Wasser dispergieren als die Salze der λ -Variante (vgl. Firma Copenhagen Pectin 1996 a, S. 6).

Um das Algenpolysaccharid vollständig in Lösung zu bringen, wird anschließend die vorbereitete Suspension bei hoher Rührgeschwindigkeit auf eine Temperatur von 80 °C erwärmt und nach Abschalten der Heizung des Magnetrührers bis zur vollständigen Homogenisierung des entstehenden Sols weiter gerührt.

Die beim Erhitzen der Carrageenan-Suspension durch Verdampfung des Solvens entstehenden Volumenverluste sind in wässrigen Systemen so gering, dass daraus resultierende Konzentrationsfehler keinen Einfluss auf die experimentellen Ergebnisse haben.

Es gilt zudem zu bedenken, dass bei relativ konzentrierten κ - und ι -Carrageenan-Solen nicht die Möglichkeit besteht, wie im Falle von Alginat-Lösungen nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit entionisiertem Wasser auf das gewünschte Endvolumen aufzufüllen, da unter diesen Bedingungen bei den genannten Polysacchariden aus Rotalgen bereits Gelbildungsprozesse einsetzen.

Die mit der Gelierung von Carrageenanen im Zusammenhang stehenden Vorgänge werden in Kapitel 3.3.2 des Theoretischen Teils näher betrachtet.

3.3.1.3 Kolloid-Charakter von Carrageenan-Lösungen

In Kapitel 3.3.1.1 des Theoretischen Teils wurde bereits angedeutet, dass Carrageenane in Wasser keine echten, sondern kolloidale Lösungen bilden. Ebenso wie Alginat gehören auch die Polysaccharid-Derivate aus Rotalgen zur Gruppe der Molekül-Kolloide. Bezüglich ihrer Wechselwirkungen mit dem Dispersionsmedium sind die Carrageenane als hydrophile Kolloide zu klassifizieren, da sie sich in Lösung vorwiegend durch Umhüllung mit Wasser-Molekülen stabilisieren. Für detailliertere Hintergrundinformationen zu den allgemeinen Charakteristika von Kolloiden sei auf den entsprechenden Exkurs im Theoretischen Teil über Alginat verwiesen (vgl. Kapitel 2.3.1.3).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein einfacher Versuch entwickelt, mit dem man – ähnlich wie bei Alginaten – auch in Carrageenan-Lösungen Kolloid-Teilchen unter Ausnutzung des Faraday-Tyndall-Effektes nachweisen kann (vgl. Experiment 38).

3.3.2 Gelbildung

3.3.2.1 Theoretischer Hintergrund

Wie im Vorangehenden aufgezeigt wurde, lösen sich die Salze aller drei Carrageenan-Typen in entionisiertem Wasser bei Temperaturen oberhalb von 70 – 75 °C unter Bildung viskoser kolloidaler Lösungen.

Eine charakteristische Eigenschaft von κ - und ι -Carrageenanen besteht nun darin, dass deren wässrige Lösungen beim Abkühlen Gele bilden, wenn der Massenanteil an Algenpolysaccharid im Sol mindestens 0,5 % beträgt (Firma Copenhagen Pectin 1996 a, S. 9).

Bei der λ -Variante ist die Gelbildungsfähigkeit hingegen nicht gegeben. Die Ursachen für dieses diskrepante Verhalten werden bei genauerer Betrachtung des Mechanismus' deutlich, auf dem die Gelierung der beiden erstgenannten Carrageenan-Typen basiert. Abbildung 66 verdeutlicht schematisch die mit der Bildung von κ - und ι -Carrageenan-Gelen verknüpften Vorgänge:

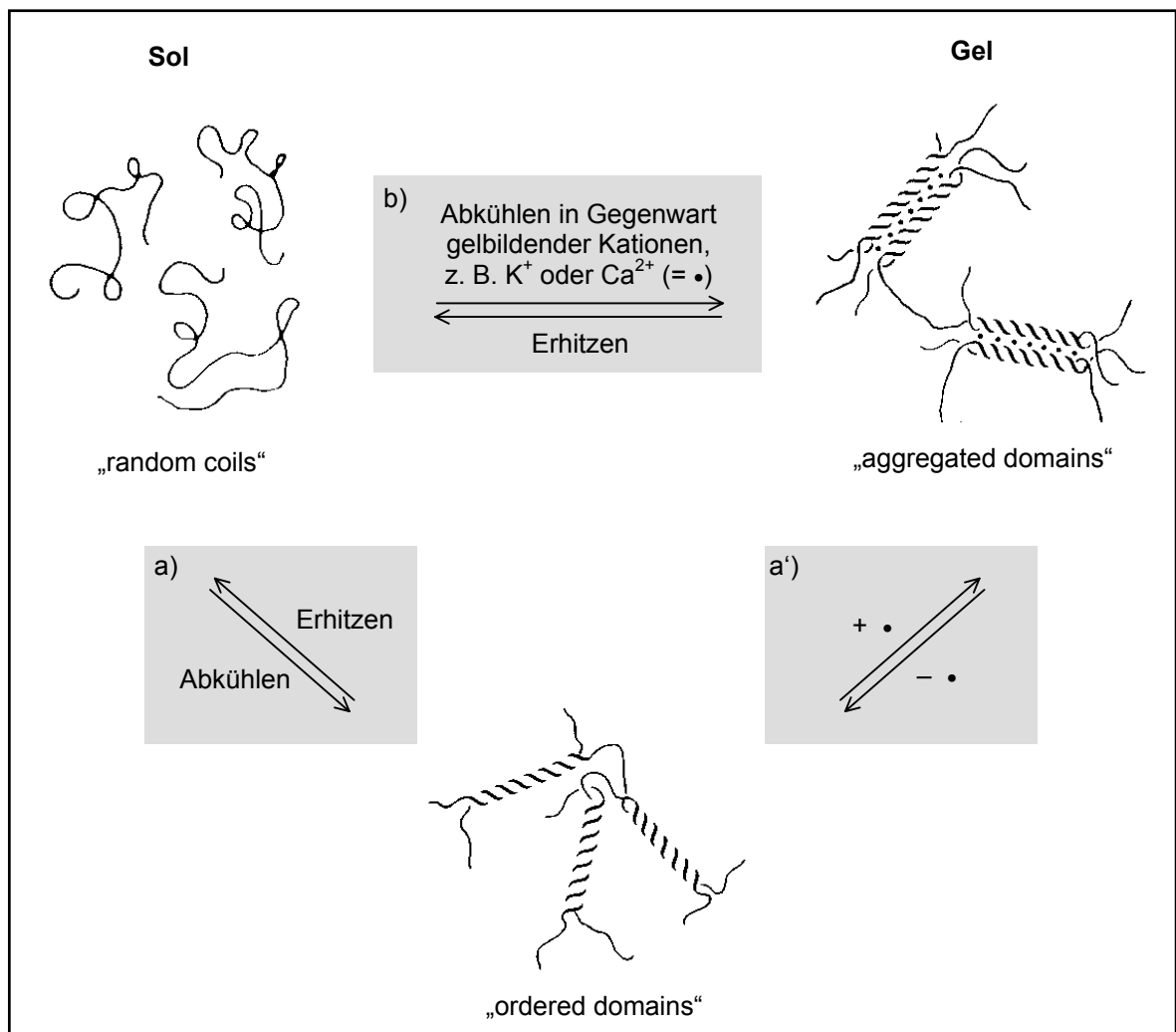


Abb. 66: Schematische Darstellung des Gelbildungsmechanismus' von κ - und ι -Carrageenanen nach dem von Morris/Rees/Robinson (1980) vorgeschlagenen „Domain Model“; Abbildung verändert nach Clark/Ross-Murphy (1986, S. 120); Morris (1986, S. 19).

Die Polyanionen aller Carrageenan-Typen liegen in heißer wässriger Lösung aus Entropiegründen ungeordnet in Form sogenannter statistischer Knäuel (engl. „random coils“) vor (Rees/Welsh 1977, S. 229).

Im Falle von κ - und ι -Carrageenanen erfolgt bei Abkühlung der Sole die Zusammenlagerung der Abschnitte jeweils zweier sich annähernder Polysaccharid-Ketten zu Doppelhelices (Voragen/Pilnik 1994 b, S. 42). Dadurch kommt es – wie in Abbildung 66 im Vorgang a) deutlich wird – zur Ausbildung von Bereichen mit geordneter Struktur (engl. „ordered domains“).

Nach Angaben von Morris (1986, S. 18 f.) besteht bei κ - und ι -Carrageenan-Sequenzen die Möglichkeit der Assoziation zu Doppelhelices, weil in diesen beiden Varianten α -D-3,6-Anhydrogalactose (κ) oder ihr in C-2-Position sulfatiertes Derivat (ι) als Baustein B der sich wiederholenden dimeren Grundeinheit $(AB)_n$ vorliegen. Die Präsenz der Anhydrobrücke bedingt, dass diese Sechsringe nicht in der normalerweise favorisierten 4C_1 -Konformation mit der CH_2 -Gruppe am C-6-Atom in äquatorialer Position vorliegen, sondern 1C_4 -Konformation einnehmen (Morris 1986, S. 19). Dies hat zur Folge, dass in κ - und ι -Carrageenanen die glykosidischen Verknüpfungen zwischen den Monomer-Resten ausschließlich diäquatorialer Natur sind, was nach Angaben von Voragen/Pilnik (1994 b, S. 42) eine entscheidende Voraussetzung für die Doppelhelixbildung darstellt.

Abbildung 67 zeigt exemplarisch eine auf die Innenfläche eines Zylindermantels projizierte linksgängige Doppelhelix von ι -Carrageenan:

Die beiden an der Helixbildung beteiligten Polysaccharid-Ketten werden durch Kennzeichnung mit durchgezogenen bzw. gestrichelten Linien voneinander unterschieden. Die Sauerstoffatome sind rot, die OH-Gruppen rot-weiß schattiert und die SO_3^- -Reste der Sulfatgruppen gelb unterlegt. Intercatenare Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den C-2-Hydroxyl-Gruppen der einen Carrageenan-Sequenz und den in C-6-Position befindlichen OH-Gruppen der zweiten Kette stabilisieren die Doppelhelix. Diese Brückenbindungen werden in Abbildung 67 durch rote Punkte angedeutet.

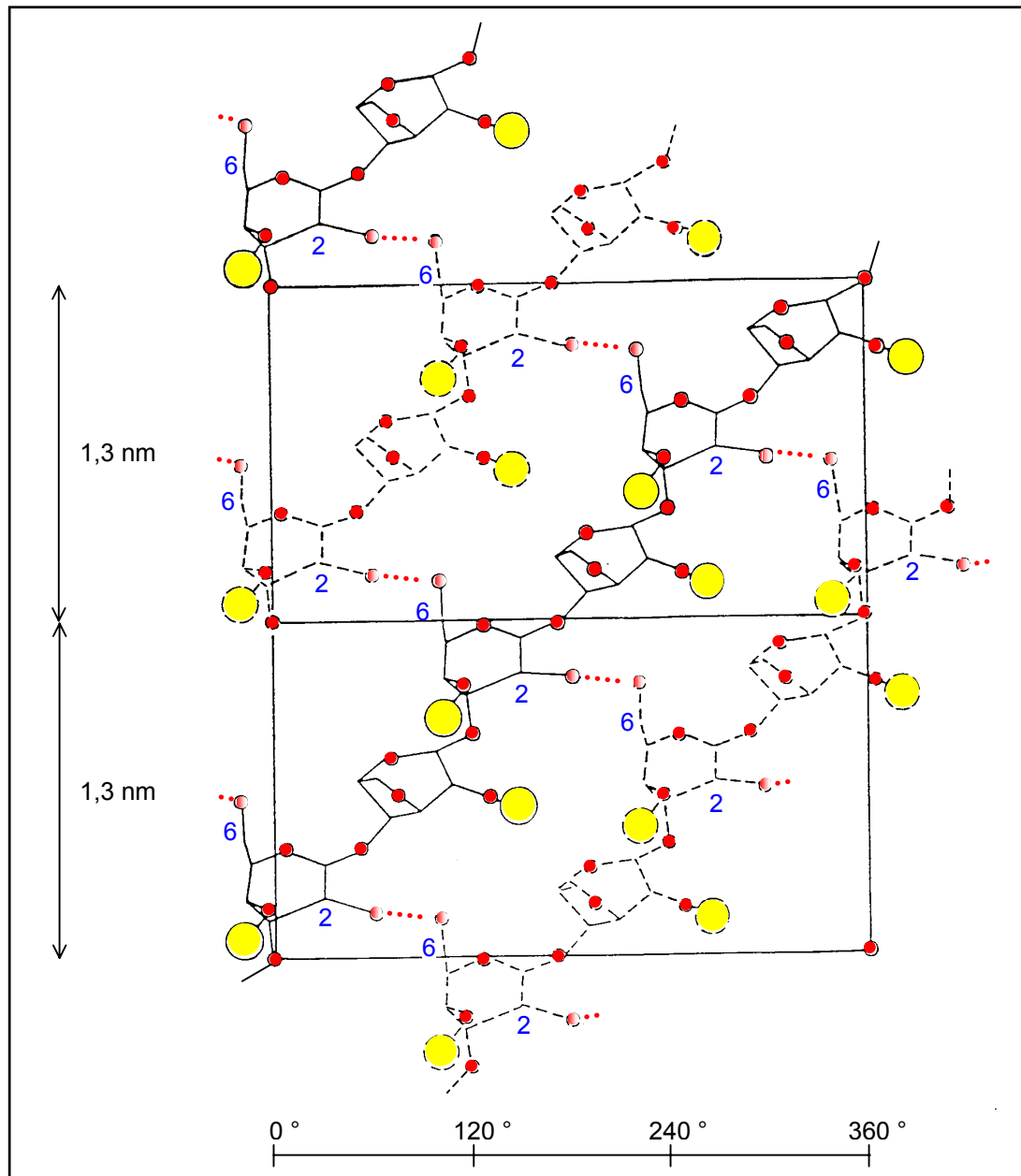


Abb. 67: Durch Röntgenstrukturanalyse ermittelte Kettenanordnung in einer Doppelhelix von ι -Carrageenan (Projektion auf die Innenfläche eines Zylindermantels); Abbildung verändert nach Anderson et al. (1969, S. 90).

Um die Struktur der ι -Carrageenan-Doppelhelix zu veranschaulichen, wurde im Rahmen der Arbeit Modell 3 entwickelt (vgl. Experimenteller Teil, Kapitel 3.2):

Man kopiert zunächst eine Schwarzweißversion der auf die Innenfläche eines Zylindermantels projizierten Helix aus Abbildung 67 auf eine transparente Folie. Letztere wird dann so zu einem Zylinder zusammengerollt, dass die bedruckte Seite nach innen gekehrt ist. Auf diese Weise erhält man eine „dreidimensionale“ Vorstellung davon, wie sich die beiden ι -Carrageenan-Ketten räumlich anordnen müssen, um eine Doppelhelix bilden zu können.

Obwohl für κ -Carrageenan die durch Röntgenbeugungsuntersuchungen erhaltenen Ergebnisse nicht so eindeutig sind, geht man auch hier von der Existenz einer Doppelhelix aus. Diese ist jedoch rechtsgängig und weist eine im Vergleich zur ι -Carrageenan-Helix verkürzte Ganghöhe sowie verschobene relative Positionen der beteiligten Polysaccharid-Ketten auf (Rees/Welsh 1977, S. 230).

Wie aus Abbildung 66 außerdem hervorgeht, können sich die Doppelhelices von κ - und ι -Carrageenanen durch Einlagerung hydratisierter Kationen geeigneter Größe (z. B. K^+ oder Ca^{2+}) weiter unter Ausbildung sogenannter „aggregated domains“ zusammenlagern. Dieser Vorgang findet sowohl dann statt, wenn das Carrageenan-Sol nachträglich mit Lösungen der betreffenden Kationen in Kontakt gebracht wird (vgl. Vorgänge a) und a'') als auch, wenn das zur Herstellung des Sols eingesetzte Carrageenan – wie in Gelbildungsvariante b) dargestellt – bereits gelinduzierende Kationen enthält. Auf diese Weise entstehen κ - bzw. ι -Carrageenan-Gele als dreidimensionale Netzwerke von Polysaccharid-Sequenzen, in deren Maschen Wasser-Moleküle eingelagert werden (Rees/Welsh 1977, S. 229; Voragen/Pilnik 1994 b, S. 42).

Durch neuere Erkenntnisse zum Gelbildungsmechanismus von ι -Carrageenanen wird allerdings in Frage gestellt, ob bei dieser Algenpolysaccharid-Variante wirklich eine Aggregation der Helices zu größeren Aggregaten erfolgt (van de Velde/De Rooter 2002, S. 263 f.).

Im Gegensatz zu κ - und ι -Carrageenanen verfügt die λ -Variante nicht über gelbildende Eigenschaften, da letztere als Baustein B anstelle der α -D-3,6-Anhydrogalactose (1C_4) einen α -D-galactose-2,6-disulfat-Rest mit 4C_1 -Konformation enthält. Offensichtlich ist das aus diesem Umstand resultierende Vorliegen alternierender äquatorial-axialer und axial-äquatorialer Glykosid-Bindungen unvereinbar mit der Geometrie der Doppelhelix (Morris 1986, S. 19; Voragen/Pilnik 1994 b, S. 42 f.). Hinderlich auf die Ausbildung geordneter helicaler Strukturen wirkt sich beim λ -Carrageenan zudem der im Vergleich zu den anderen Varianten hohe Sulfatierungsgrad aus: Die Anordnung der Sulfat-Gruppen auf beiden Seiten der Polysaccharid-Kette bringt nicht nur eine größere räumliche Ausdehnung der λ -Carrageenan-Moleküle mit sich, sondern bedingt auch eine stärkere elektrostatische Abstoßung der Polyanion-Sequenzen untereinander, durch welche deren Annäherung erschwert wird (Firma System Bio-Industries 1987, S. 64).

Zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen der räumlichen Gestalt von κ - und ι -Carrageenan einerseits und λ -Carrageenan auf der anderen Seite werden einander in Abbildung 68 Kugel-Stab-Modelle der betreffenden Polysaccharid-Sequenzen gegenübergestellt.

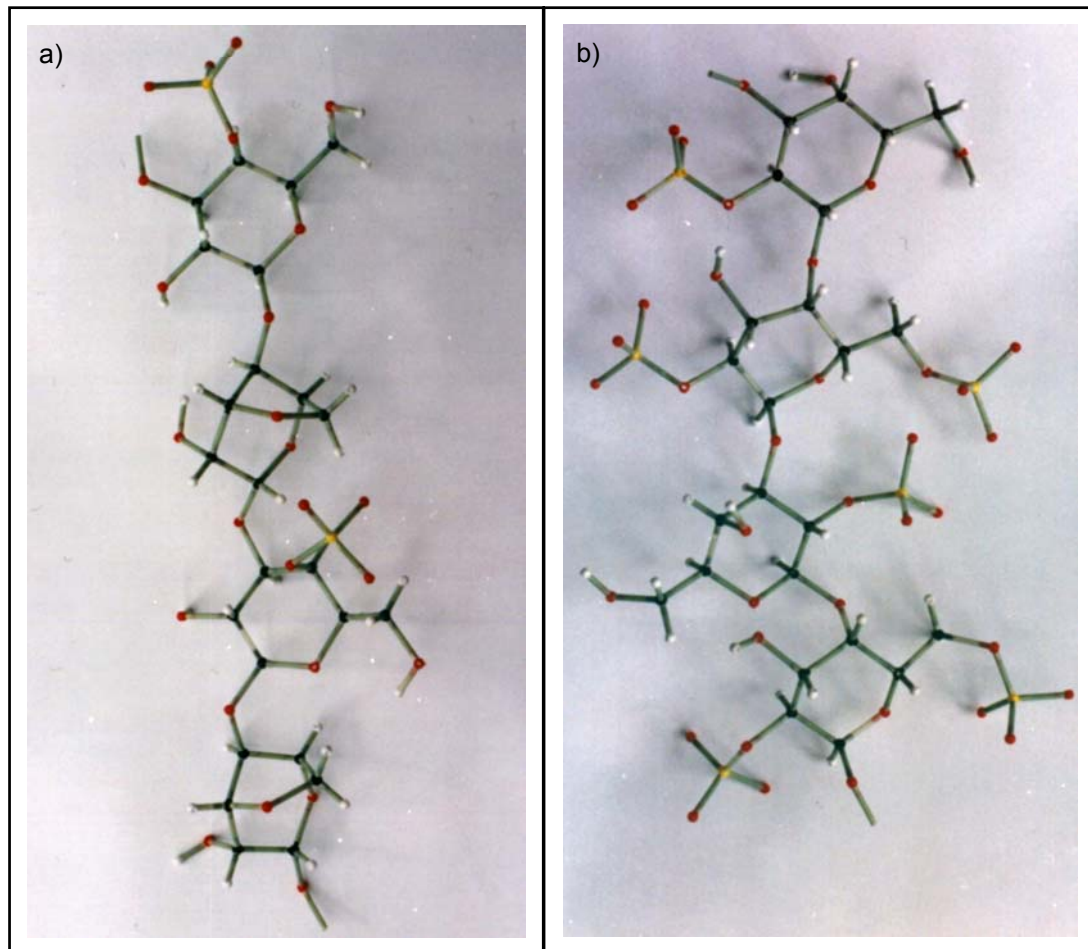


Abb. 68 Kugel-Stab-Modelle verschiedener Carrageenan-Typen: a) gelbildungsfähige κ -Variante, b) nicht gelierendes λ -Carrageenan.

Kommerziell erhältliche κ - und ι -Carrageenane gelieren üblicherweise in einem Temperaturbereich zwischen 40 und 70 °C (Thomas 1997, S. 52). Die Geliertemperatur eines Carrageenan-Sols ist zwar praktisch unabhängig von der Konzentration der Polysaccharid-Anionen, aber sie wird stark beeinflusst durch die Art und die Menge der in der Lösung vorhandenen Gegenionen (Guiseley 1989, S. 709). In diesem Zusammenhang muss allerdings berücksichtigt werden, dass handelsübliche Carrageenane in der Regel bereits Gegenionen, wie beispielsweise K^+ und Ca^{2+} enthalten, durch welche die Gelbildung induziert wird. Eine Erhöhung der Carrageenan-Konzentration ist unter diesen Umständen zwangsläufig mit einer Steigerung der Konzentration dieser gelbildenden Kationen verbunden. Die Angabe einer genauen Geliertemperatur ist daher nur für jedes Carrageenan-Produkt individuell möglich (Guiseley 1989, S. 709).

Ein weiteres Charakteristikum von κ - und ι -Carrageenan-Gelen besteht in ihrer Thermo-reversibilität: Zwar weisen diese Gele bei Raumtemperatur Stabilität auf, aber ein Erhitzen um etwa 5 – 10 °C über die ursprüngliche Geliertemperatur bedingt deren Schmelzen unter Rückbildung von Solen. Ein erneuter Sol-Gel-Übergang tritt dann beim Abkühlen der entstandenen Algenpolysaccharid-Lösungen auf (Thomas 1997, S. 52).

Die thermoreversible Natur der κ - und ι -Carrageenangele wird plausibel, wenn man sich die Tatsache vor Augen führt, dass die Doppelhelices, deren Ausbildung die Grundlage für die Gelierung darstellt, lediglich durch Wasserstoff-Brückenbindungen stabilisiert werden. Letztere sind so schwach, dass sie sich durch Temperaturerhöhung aufbrechen lassen (Firma Systems Bio-Industries 1987, S. 58).

3.3.2.2 Experimentelle Umsetzung

Experiment 37 b) der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Ziel entwickelt, die Unterschiede in den Gelbildungseigenschaften von κ -, ι -, und λ -Carrageenanen zu veranschaulichen: Zunächst versetzt man in drei Petrischalenunterteilen 20-mL-Proben der in Versuchsteil a) hergestellten und auf $\vartheta = 60$ °C temperierten κ -, ι - und λ -Carrageenan-Lösungen ($c \approx 0,025$ mol/L) mit je 2 mL $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 1,5$ mol/L). Dabei wird durch Rühren mit einem Glasstab für eine gute Durchmischung gesorgt.

Die Untersuchung der durch Kalium-Ionen induzierten Gelbildung erfolgt anschließend auf analoge Weise, indem man in 20-mL-Proben der verschiedenen Carrageenan-Sole unter Rühren je 2 mL KCl-Lösung ($c = 1,5$ mol/L) einbringt.

Wie die Photographien der Versuchsergebnisse in Abbildung 69 zeigen, gelieren κ - und ι -Carrageenan-Sole sowohl in Gegenwart von Calcium-Ionen als auch bei Zusatz von Kalium-Ionen:

Die Ca^{2+} - und K^+ -Gele von κ -Carrageenan sind sehr fest und zeigen Synäreseerschei- nungen, d. h. es tritt Wasser aus dem dreidimensionalen Polysaccharid-Netzwerk aus.

ι -Carrageenan hingegen bildet mit beiden Kationen schwächere Gele, die aber eine hohe Elastizität und Transparenz aufweisen.

Bei der Lösung der λ -Variante tritt weder bei Versetzen mit Calcium- noch mit Kaliumchlorid-Lösung ein Sol-Gel-Übergang ein.

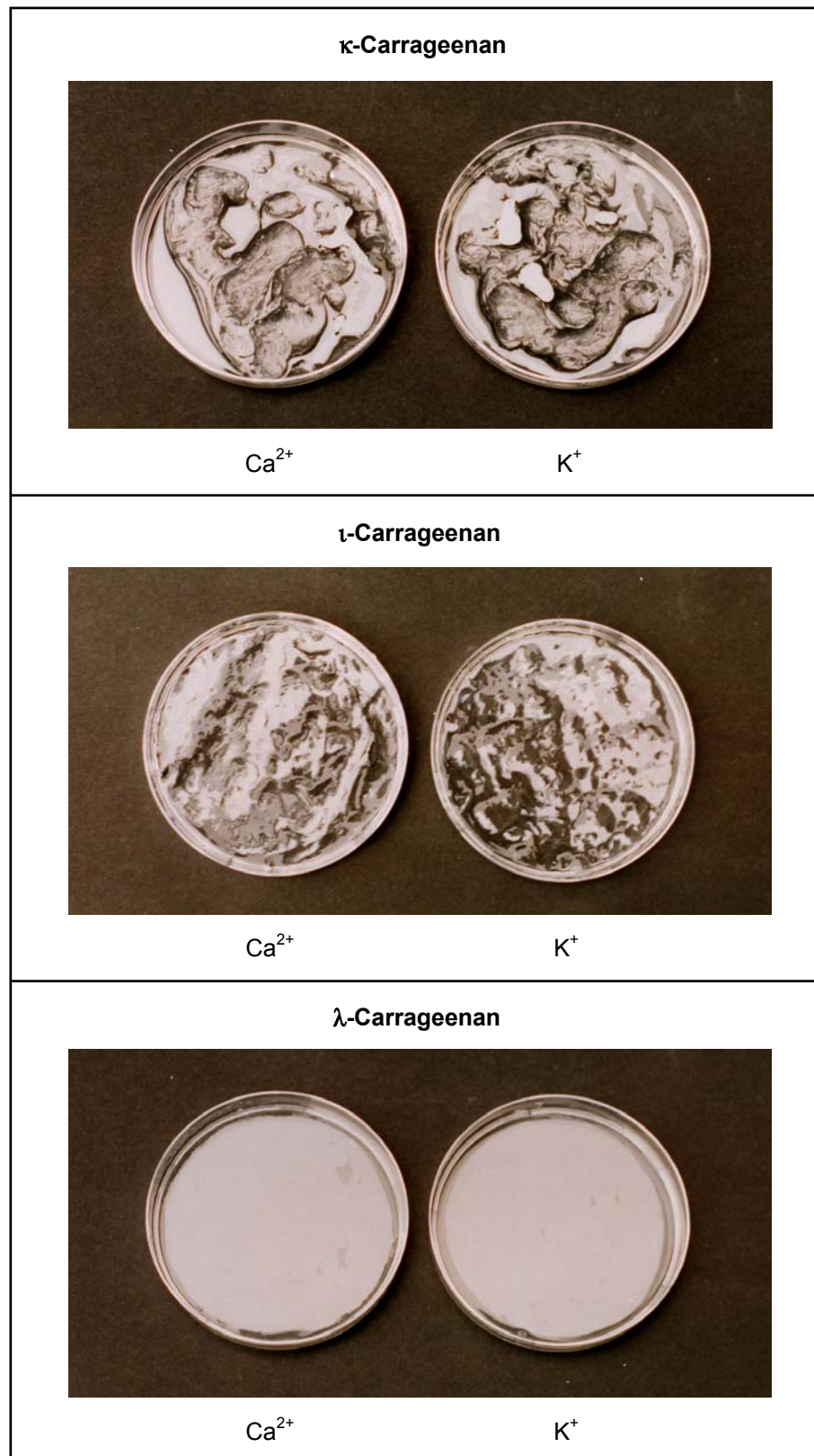


Abb. 69: Vergleich der Gelbildungseigenschaften von κ -, ι - und λ -Carrageenanen (Experiment 37 b)).

3.3.3 Stabilisierung von Emulsionen und Suspensionen

3.3.3.1 Theoretischer Hintergrund

Neben den Sol- und Gelbildungseigenschaften der Carrageenane, die in den vorangehenden beiden Kapiteln diskutiert wurden, spielt anwendungstechnisch auch besonders deren emulsions- und suspensionsstabilisierende Wirkung eine Rolle.

Auf die Charakteristika von Emulsionen und Suspensionen soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden, da bereits im Alginat-Teil eine Auseinandersetzung mit diesem Thema erfolgte (vgl. Kapitel 2.3.3).

Die Fähigkeit der Carrageenane, als Emulsions- und Suspensionsstabilisatoren zu wirken, beruht im Wesentlichen auf der Schutzkolloid-Funktion dieser Polysaccharid-Derivate:

Zum einen erhöhen sie die Viskosität der wässrigen Phase und setzen dadurch die Geschwindigkeit der Phasentrennung herab.

Zum anderen bilden die Carrageenane aufgrund ihres Polyanion-Charakters negativ geladene Filme um die emulgierten Öl-Tröpfchen bzw. suspendierten Feststoff-Partikel, an die sich im Dispersionsmittel gelöste Kationen anlagern. Die dabei entstehende elektrische Doppelschicht (Atkins 1990, S. 647) bedingt eine gegenseitige elektrostatische Abstoßung der dispergierten Teilchen erschwert deren Aggregation. Am Beispiel der Alginate wurde dieser Effekt bereits modellhaft in Kapitel 2.3.3.2 verdeutlicht.

3.3.3.2 Experimentelle Umsetzung

Zur Veranschaulichung der emulsions- und suspensionsstabilisierenden Wirkung von Carrageenanen wurden zwei Versuche entwickelt:

Experiment 39 macht deutlich, dass sich eine mit λ -Carrageenan stabilisierte O/W-Emulsion, deren Öl-Phase mit Sudanrot B angefärbt ist, viel langsamer entmischt als eine wasserhaltige Vergleichsprobe. Der Versuch zeigt weiterhin, wie sich die Stabilisatorfunktion des Algenpolysaccharids durch Erhöhung der Carrageenan-Konzentration in der Emulsion optimieren lässt.

In Experiment 40 wird anhand eines einfachen dispersen Systems demonstriert, wie in der wässrigen Phase gelöstes λ -Carrageen die Sedimentation der suspendierten Feststoff-Partikel (= Seesand) hemmt. Als Vergleichsprobe setzt man hier wiederum entionisiertes Wasser ein.

3.4 Gewinnung aus Rotalgen

3.4.1 Rohstoffquellen und Ernte

Tabelle 52 gibt einen Überblick über die wichtigsten Rotalgen-Arten der Ordnung Gigartinales, die als Ausgangsmaterial für die industrielle Carrageenan-Gewinnung genutzt werden.

Tab. 52: Rohstoffquellen für die kommerzielle Carrageenan-Gewinnung (Briand 1991, S. 280; Firma Systems Bio-Industries 1987, S. 28; Glicksman 1983 b, S. 85; Stanley 1990, S. 84).

Rotalgen-Art	Vorkommen	Beispiele	
<i>Chondrus crispus</i>	Kanada, USA, Frankreich, Irland		
<i>Chondrus ocellatus</i>	Korea		
<i>Gigartina stellata</i>	Frankreich, Spanien		
<i>Gigartina acicularis</i>	Frankreich, Spanien, Portugal, Marokko		
<i>Gigartina pistillata</i>	Frankreich, Spanien, Portugal, Marokko		
<i>Gigartina canaliculata</i>	Mexiko		
<i>Gigartina chamissoi</i>	Mexiko, Peru, Chile		
<i>Gigartina radula</i>	USA, Chile		
<i>Gigartina skottsbergii</i>	Chile, Argentinien		
<i>Hypnea musciformis</i>	USA, Brasilien, Senegal		
<i>Eucheuma cottonii</i> ^a	Philippinen, Indonesien		Getrocknete Rotalgen: a) <i>Chondrus crispus</i> , b) <i>Gigartina radula</i> , c) <i>Eucheuma cottonii</i> .
<i>Eucheuma spinosum</i> ^b	Philippinen, Indonesien		

^a Nach neuer Systematik wird die früher unter den Namen *Eucheuma cottonii* bekannte Rotalge als *Kappaphycus cottonii* bezeichnet. *Kappaphycus cottonii* stellt eigentlich auch nur einen Oberbegriff für zwei verschiedene Spezies dar: *Kappaphycus striatum* und *Kappaphycus alvarezii* (Zemke-White; van de Velde/De Ruyter 2002, S. 250 f.). Da aber sowohl in der Fachliteratur als auch in der Rotalgen- und Carrageenan-Industrie weiterhin die Bezeichnung *Eucheuma cottonii* üblich ist, wird diese auch durchgängig in der vorliegenden Arbeit verwendet.

^b *Eucheuma spinosum* heißt nach neuer Systematik *Eucheuma denticulatum* (Zemke-White; van de Velde/de Ruyter 2002, S. 250 f.). Aus den in Anmerkung a genannten Gründen wird in der vorliegenden Arbeit allerdings weiterhin der alte Artname benutzt.

Da die meisten der in Tabelle 52 angegebenen Rhodophyta im Bereich felsiger Meeresküsten wachsen, sind sie so schwer zugänglich, dass ihre Ernte selbst heutzutage nur unter Anwendung relativ primitiver und arbeitsintensiver Methoden erfolgen kann (van den Hoek/Jahns/Mann 1993, S. 39):

So werden z. B. bei Niedrigwasser trocken fallende Algen-Felder manuell von Pflückern abgeerntet (Overath/Luider 1994, S. 84). Des Weiteren spielt auch das Sammeln von nach Stürmen am Strand angespülten Carrageenophyten immer noch eine Rolle (Glicksman 1983 b, S. 86).

Selbst auf ausgedehnte Rotalgen-Vorkommen, die in größeren Wassertiefen lokalisiert sind, kann nur von kleinen Booten aus zugegriffen werden. Dabei kommen Hilfsmittel zum Einsatz, die eine halbmechanische Ernte erlauben (Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 223; Voragen/Pilnik 1994 b, S. 41). In den maritimen Provinzen von Kanada, wie z. B. Neuschottland, erntet man auf diese Weise jährlich etwa 50.000 Tonnen *Chondrus crispus* aus natürlichen Vorkommen. Dazu werden u. a. die in Abbildung 70 b) dargestellten Rechen benutzt.

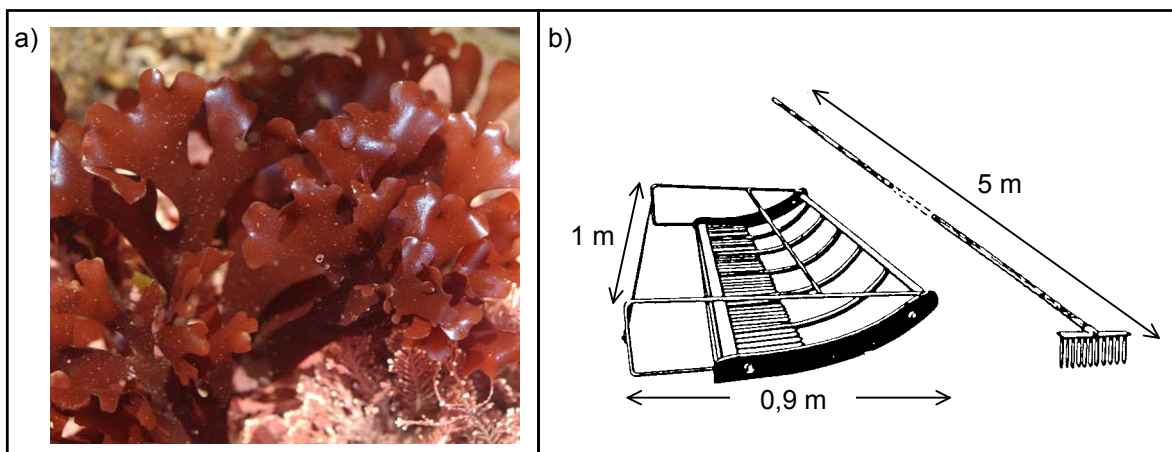


Abb. 70: Rohstoffquelle *Chondrus crispus*: a) Beispiexemplar der Rotalge (Guiry/Nic Dhonncha 2003), b) Hilfsmittel für die halbmechanisch *Chondrus crispus*-Ernte in Kanada: „drag rake“ (links) und „hand rake“ (rechts) (Briand 1991, S. 284; verändert).

Die aus natürlichen Vorkommen erhaltenen Rotalgen werden in der Regel bereits am Ernteort getrocknet. Zu diesem Zweck setzt man zwar immer häufiger Spezialöfen ein, aber auch das Trocknen der Carrageenophyten an der Sonne wird zur Kosteneinsparung immer noch praktiziert.

Die auf diese Weise vorbehandelten Rotalgen werden anschließend zu den Produktionsstätten der Firmen transportiert, in denen die großtechnische Carrageenan-Gewinnung erfolgt (Baird 1994, S. 850; Glicksman 1983 b, S. 87; Lewis/ Stanley/Guist 1988, S. 224).

Angesichts des weltweit steigenden Bedarfes an Carrageenan haben auch Rotalgen aus marinen Kulturen eine nicht zu unterschätzende Bedeutung als Rohstoffquelle für die Gewinnung dieses Algenpolysaccharids erlangt. Mit dem gezielten Anbau von Carrageenophyten sind folgende Vorteile verbunden (Firma Copenhagen Pectin 1996 a, S. 3; Glicksman 1983 a, S. 66; Lewis/Stanley/ Guist 1988, S. 223):

- Für marine Kulturen können gezielt Rotalgen-Spezies ausgewählt werden, die schnell wachsen, widerstandsfähig sind und über eine günstige Carrageenan-Zusammensetzung sowie einen hohen Gehalt des Polysaccharid-Derivats verfügen.
- Des Weiteren besteht bei kultivierten Algen eine größere Unabhängigkeit von klimatischen Bedingungen.
- Außerdem sind die mit der Ernte verbundenen Tätigkeiten bei Rotalgen-Kulturen weniger zeit- und arbeitsintensiv und somit kostengünstiger.

Inzwischen stammt etwa die Hälfte der jährlichen Weltproduktion an Carrageenan aus Algen der Gattung *Euचेuma* (Lüning 1985, S. 292), die seit dem Jahre 1971 verstärkt in Meeresfarmen auf den Philippinen gezüchtet werden (Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 223). Bei den meisten gängigen Anbaumethoden werden *Euचेuma*-Ableger in Abständen von etwa 25 cm an Plastikseile geknüpft. Diese mit Algen bestückten Seile befestigt man dann 25 – 50 cm über dem Meeresboden an Holzpfählen („Fixed Off-Bottom Technique“) oder an auf dem Meerwasser schwimmenden Bambusstäben, die mit Gewichten im Boden verankert werden („Floating Raft Technique“). Wenn die *Euचेuma*-Pflanzen nach etwa zwei Monaten ein Gewicht von ungefähr einem Kilogramm erreicht haben, kann ihre Ernte erfolgen. Dies geschieht in der Regel vom Boot aus. Die kultivierten Algen werden dann vor Ort durch Ausbreitung am Strand oder auf Bambus-Gestellen getrocknet, manuell von Verunreinigungen, wie z. B. Kies, Muschelschalen und Plastikresten, befreit und anschließend an die Carrageenan-Industrie geliefert (Firma Asiagel, SEAFDEC, Zemke-White).

Abbildung 71 verdeutlicht obige Erläuterungen zum *Euचेuma*-Anbau auf den Philippinen.

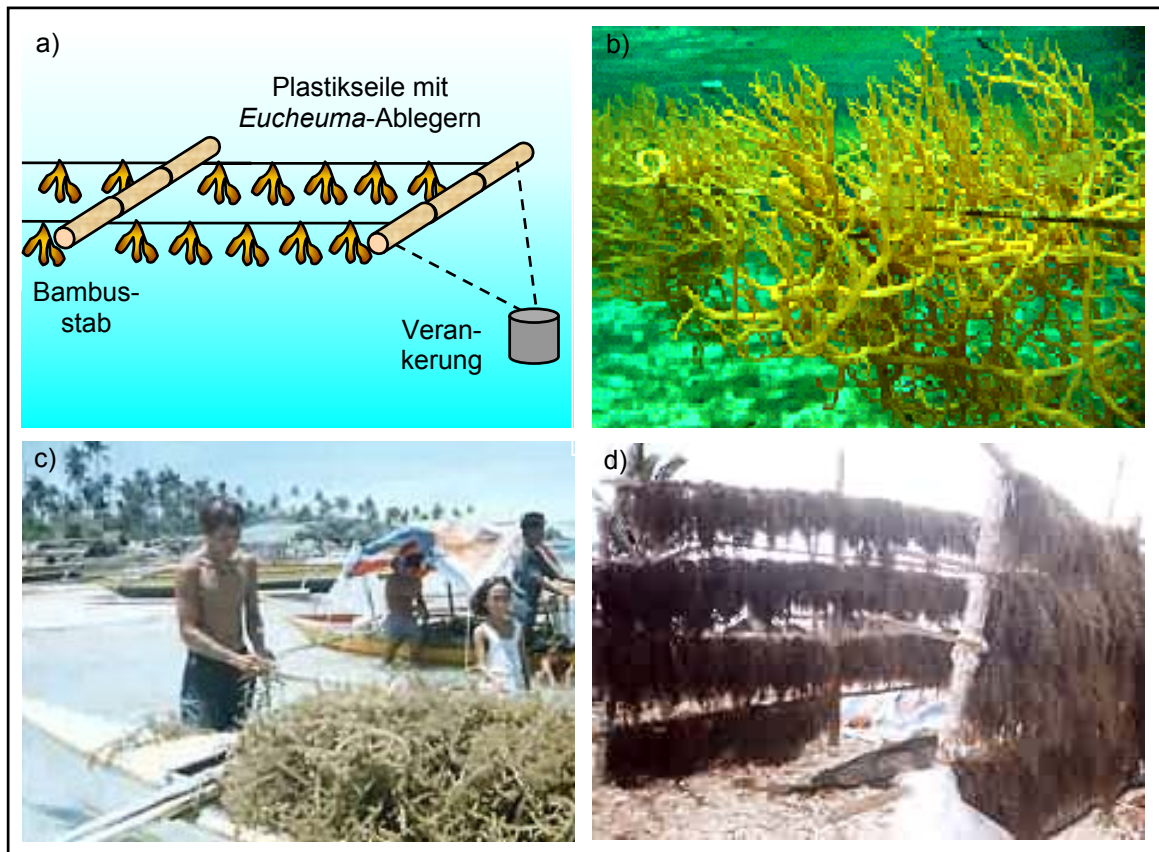


Abb. 71: Anbau von *Eucheuma* auf den Philippinen: a) Schematische Darstellung der „Floating Raft Technique“ (verändert nach SEAFDEC), b) Exemplar einer am Plastikseil befestigten kultivierten Rotalge (Firma Shemberg 2003 a), c) Boote mit geernteten *Eucheuma* (Firma Asiagel 2001), d) Trocknung der Rotalgen auf Bambus-Gestellen (Firma Asiagel 2001).

3.4.2 Großtechnisches Produktionsverfahren

Der Carrageenan-Gehalt getrockneter Rotalgen liegt im Durchschnitt etwa bei 25 %, kann aber in Extremfällen auch bis zu 70 % der Trockenmasse betragen (Lüning 1985, S. 283; Voragen/Pilnik 1994, S. 41). Die verschiedenen Carrageenan-Typen liegen im nativen Zustand als Gemisch von K^+ -, Na^+ -, Mg^{2+} - und NH_4^+ -Salzen vor (Glicksman 1983, S. 84). Hauptinhaltsstoffe der Rotalgen, von denen das Carrageenan im Laufe des Extraktionsprozesses abgetrennt werden muss, sind das Strukturpolysaccharid Cellulose sowie Proteine und Photosynthesefarbstoffe⁵.

⁵ Neben Chlorophyll a enthalten die Chloroplasten der Rotalgen Phycoerythrin als akzessorisches Pigment. Dieses ist für die rote Farbe der Rhodophyta verantwortlich. Des Weiteren kommen die blauen Pigmente Phycocyanin und Allophycocyanin sowie verschiedene Carotinoide vor (van den Hoek/Jahns/Mann 1993, S. 41).

Außerdem enthalten Rhodophyta so genannte Reservestoffe. Dabei handelt es sich um Substanzen, die die Pflanzen intrazellulär ablagern und bei Bedarf (z. B. bei Nahrungsmangel) wieder in den Stoff- u. Energiewechsel einschleusen (Falbe/Regitz 1995 e, S. 3847). Die wichtigsten Reservestoffe der Carrageenophyten sind Florideenstärke – ein weitgehend aus 1,4-glykosidisch verknüpfter α -D-Glucose bestehendes Polysaccharid – und das Glycerinalgalactosid Floridosid (Fott 1971, S. 223; Lüning 1985, S. 282 f.).

Die Methoden der großtechnischen Gewinnung von Carrageenanen variieren in Abhängigkeit vom Hersteller, und die spezifischen Details des Produktionsprozesses fallen unter das Firmengeheimnis (Baird 1994, S. 850; Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 224).

Die den industriellen Verfahren zugrundeliegenden Prinzipien sind jedoch aus Überblicksveröffentlichungen (z. B. Glicksman 1983, S. 87 f.; Stanley 1990, S. 83 – 85) und Firmenschriften (vgl. u. a. Firma Copenhagen Pectin 1996 a, S. 3 f.; Firma Systems Bio-Industries 1987, S. 32 f.) bekannt.

Im Folgenden soll exemplarisch ein industriell bedeutsames Verfahren zur Gewinnung von Reincarrageenan vorgestellt werden, dessen wichtigste Produktionsschritte in Abbildung 72 in Form eines Flussdiagramms zusammengefasst sind:

Vorbehandlung der Algen

Die getrockneten Rotalgen werden zunächst mit Wasser gewaschen, um sie von äußerlich anhaftenden Verunreinigungen, wie z. B. im Meerwasser gelösten Salzen, marinen Organismen sowie Sand und Steinen, zu befreien (Glicksman 1983 b, S. 87; Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 224).

Heißextraktion

Die so vorbehandelten Algen werden anschließend einer Heißextraktion im alkalischen Milieu unterzogen. Als baseliefernde Komponente setzt man dabei in der Regel verdünnte Natronlauge ein. Es besteht aber auch die Möglichkeit, Calciumhydroxid zu verwenden (Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 224). Der Extraktionsprozess wird bei $\vartheta = 130$ °C durchgeführt und kann 1 – 24 Stunden dauern (Stanley 1990, S. 84; Voragen/Pilnik 1994 b, S. 42).

Die dabei stattfindenden Vorgänge sollen im Folgenden detaillierter betrachtet werden:

Das Erhitzen hat die Funktion, die in den gemahlene Rotalgen enthaltenen Carrageenane – unabhängig vom Typ und den vorliegenden Gegenionen – möglichst vollständig in Lösung zu bringen. Hier nutzt man also die für alle Carrageenane charakteristische Heißwasserlöslichkeit aus (vgl. Teil B, Kapitel 3.3.1.1).

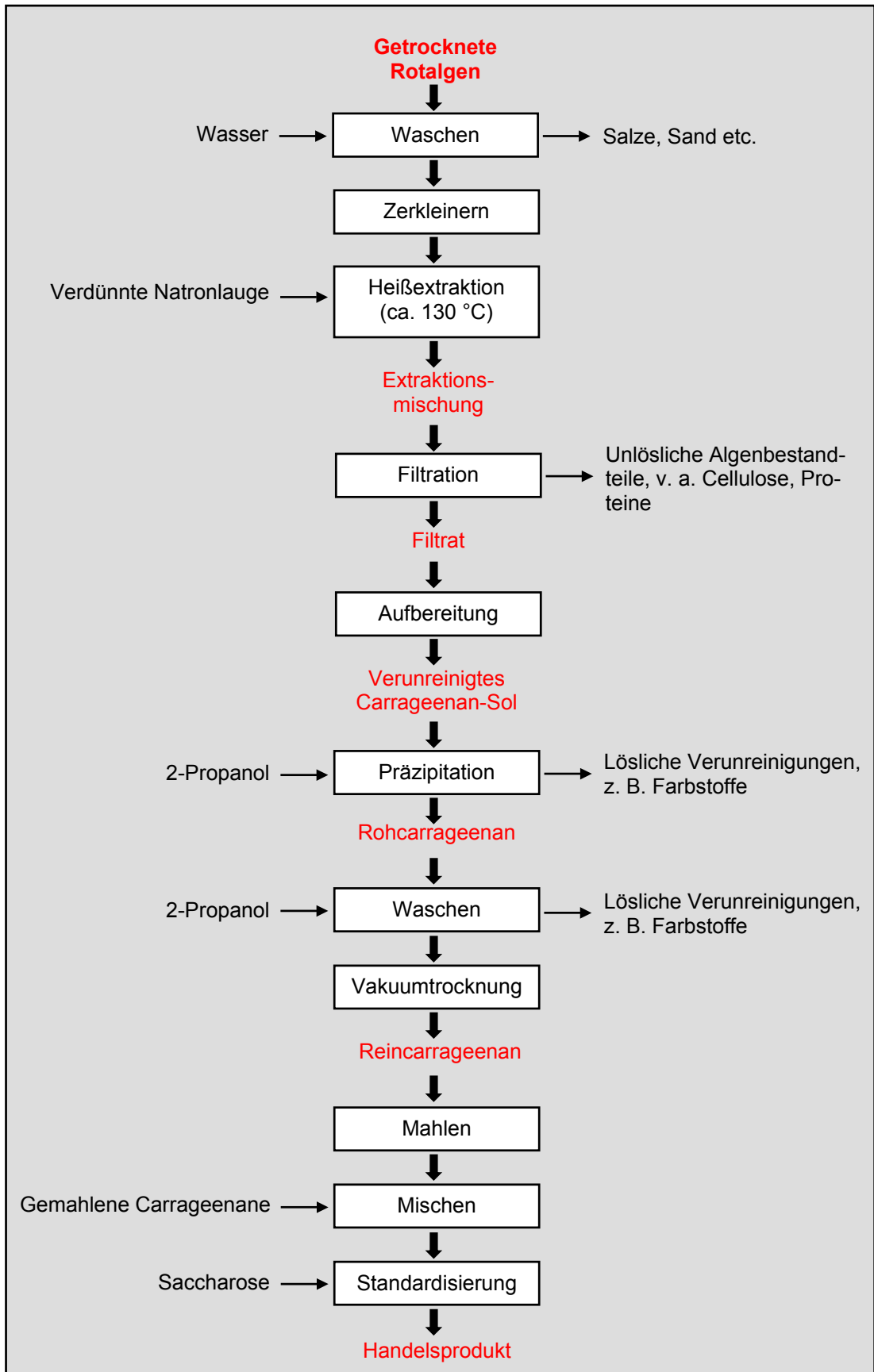


Abb. 72: Prinzip eines wichtigen großtechnischen Verfahrens zur Gewinnung von Reincarrageenan (Firma Copenhagen Pectin 1996 a, S. 4; Firma Systems Bio-Industries 1987, S. 33; Glicksman 1983, S. 88; Voragen/Pilnik 1994, S. 42; verändert).

Die Hitzebehandlung wird im alkalischen Milieu durchgeführt, weil unter diesen Bedingungen biologische Vorstufen, so genannte μ - und ν -Carrageenane, in gelbildungsfähige κ - und ι -Sequenzen überführt werden.

Die in den Algen-Zellwänden lokalisierten nativen Carrageenane entsprechen nämlich in ihrer Zusammensetzung nicht exakt den in Teil B, Kapitel 3.2.1 diskutierten Idealtypen κ , ι und λ , sondern verfügen partiell über Sequenzen, die als biologische Vorstufen dieser Varianten gelten.

Abbildung 73 gibt Aufschluss über den chemischen Aufbau und die Struktur von μ - und ν -Carrageenanen, bei denen es sich um Vorläufer-Polysaccharide des κ - bzw. des ι -Typs handelt (Guiseley/Stanley/Whitehouse 1980, S. 5-2). Wie λ -Carrageenan enthalten die μ - und ν -Varianten als Baustein B keinen α -D-3,6-Anhydrogalactose-Rest (1C_4), sondern ein in C-6-Position sulfatiertes Derivat der α -D-Galactose, welches 4C_1 -Konformation einnimmt.

Aufgrund des Vorliegens alternierender äquatorial-axialer und axial-äquatorialer Glykosid-Bindungen sind die μ - und ν -Varianten daher ebenfalls nicht in der Lage, unter Ausbildung von Doppelhelices zu gelieren (vgl. Guiseley/Stanley/Whitehouse 1980, S. 5-2).

Da aber gerade die Gelbildungsfähigkeit von κ - und ι -Carrageenanen eine entscheidende Voraussetzung für deren industrielle Verwendbarkeit darstellt, muss dafür Sorge getragen werden, dass eine möglichst quantitative Umwandlung der im nativen Zustand vorhandenen biologischen Vorstufen μ und ν in die κ - und ι -Varianten erfolgt. Dies geschieht dadurch, dass bei Behandlung mit heißer Natronlauge die B-Bausteine der Vorläufer-Polysaccharide, d. h. also α -

sulfat (ν), unter Bildung der entsprechenden α -D-3,6-Anhydrogalactose-Bausteine desulfatiert werden. Diese basenkatalysierte intramolekulare S_N -Reaktion und geht mit einem

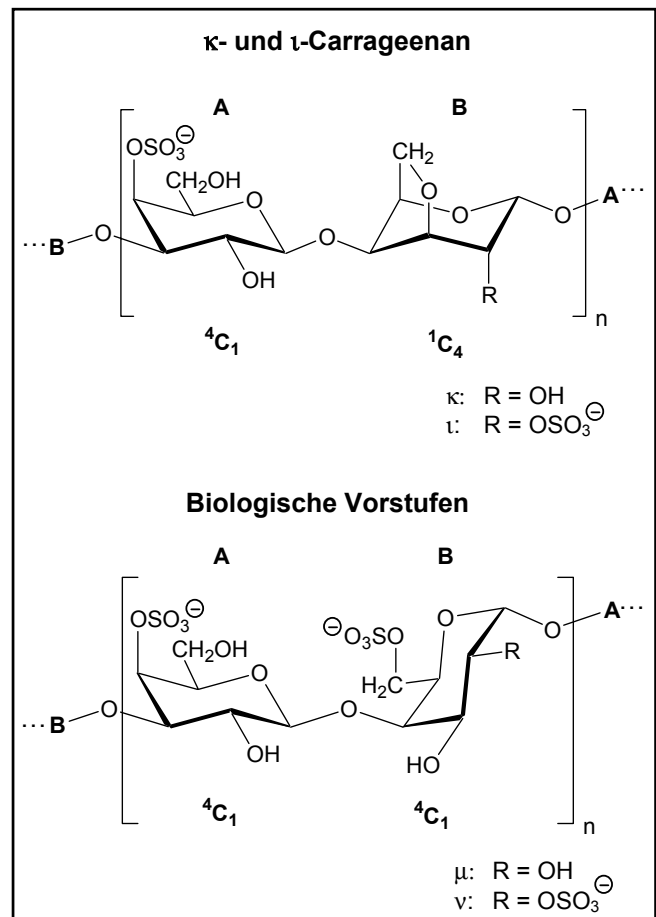
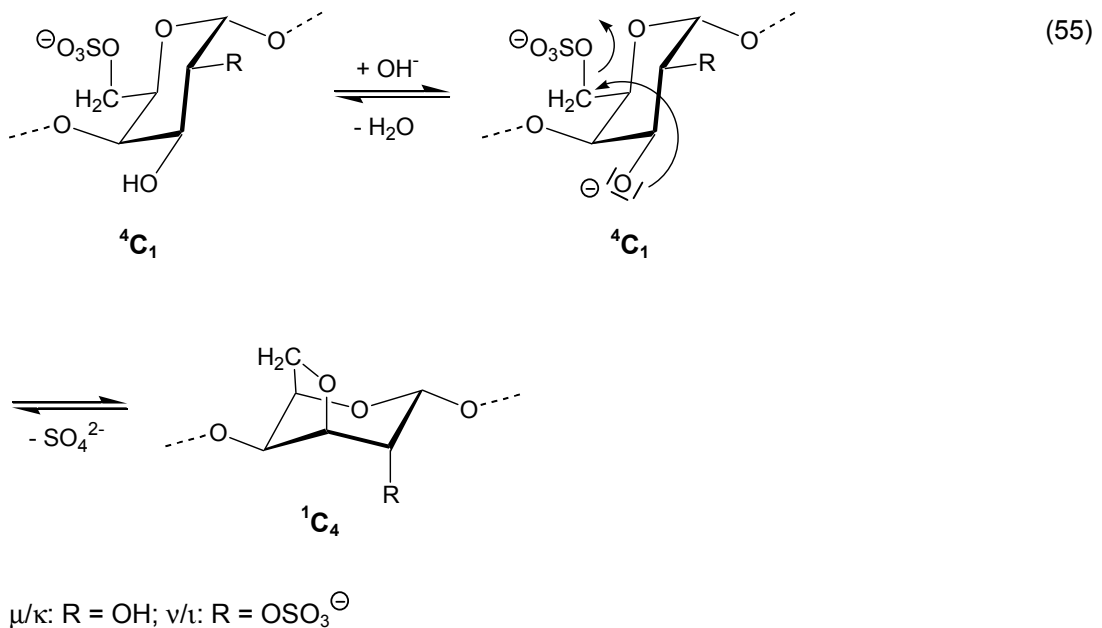


Abb. 73: κ - und ι -Carrageenan und deren biologische Vorstufen μ und ν (Firma Systems Bio-Industries 1987, S. 27; Stanley 1990, S. 81; verändert) (A, B: vgl. Abb. 64).

Konformationswechsel von 4C_1 nach 1C_4 einer (Guiseley/Stanley/Whitehouse 1980, S. 5-2). Gleichung (55) beschreibt mechanistische Details.



Der Grad der Konvertierung der in C-6-Position sulfatierten α -D-Galactose-Reste in die α -D-3,6-Anhydrogalactose-Derivate lässt sich über den pH-Wert des Extraktionsansatzes sowie die Reaktionstemperatur und -zeit steuern (Glicksman 1983 b, S. 87).

Im λ -Carrageenan wird unter Extraktionsbedingungen der als Baustein B fungierende α -D-Galactose-2,6-disulfat-Rest (4C_1) ebenfalls unter Konformationsänderung desulfatiert, wobei – wie im Falle des ι -Carrageenans – α -D-3,6-Anhydrogalactose-2-sulfat (1C_4) gebildet wird. Dennoch weist auch alkalimodifiziertes λ -Carrageenan, welches auch als θ -Variante bezeichnet wird, keine gelbildenden Eigenschaften auf (Guiseley/Stanley/Whitehouse 1980, S. 5-2).

Filtration

Die noch heiße Extraktionsmischung wird im nächsten Schritt durch Filtration von den Bestandteilen der Carrageenophyten befreit, die unter den angegebenen Reaktionsbedingungen nicht in Lösung gegangen sind. Dabei handelt es sich vor allem um Cellulose und unlösliche Proteine.

Da die Mischung wegen der Präsenz des gelösten Carrageenans eine relativ hohe Viskosität aufweist, ist die Verwendung spezieller Hilfsmittel erforderlich:

In der Firma Systems Bio-Industries (1987, S. 32) erfolgt die Abtrennung der festen Algenrückstände beispielsweise durch Heißfiltration über Leinengewebe, wobei unter Druck und Einsatz eines Filterhilfsstoffes gearbeitet wird. Andere Hersteller hingegen führen die-

se Operation mit Hilfe von Filterpressen in Gegenwart von Kieselgur aus (Glicksman 1983 b, S. 87).

Aufbereitung des Filtrats

Das resultierende Filtrat enthält nun neben Carrageenan noch alle anderen löslichen Algeninhaltsstoffe – in erster Linie Photosynthesefarbstoffe und hydrolytische Abbauprodukte der in den Carrageenophyten vorhandenen Kohlenhydrate und Proteine – und muss daher weiter aufbereitet werden.

Durch Behandlung mit Aktivkohle können die im Filtrat vorliegenden Photosynthesefarbstoffe bereits vor der Isolierung des Carrageenans partiell entfernt werden. Dieser Reinigungsschritt ist jedoch nicht bei allen Herstellern Bestandteil des Gewinnungsverfahrens (Glicksman 1983 b, S. 87; Stanley 1990, S. 85).

In der Regel wird das über einen durchschnittlichen Carrageenan-Gehalt von $w = 1 - 2\%$ verfügende Filtrat lediglich durch Vakuumverdampfung des Lösungsmittels aufkonzentriert. Dabei erhält man ein Carrageenan-Sol, dessen Massenanteil an Algenpolysaccharid zwischen 2,5 und 3,0 % liegt (Stanley 1990, S. 85).

Isolierung von Rohcarrageenan

In dem hier beschriebenen Verfahren wird das Carrageenan aus dem aufkonzentrierten Filtrat durch Ausfällung mit 2-Propanol isoliert (Firma Copenhagen Pectin 1996 a, S. 4; Firma Systems Bio-Industries 1987, S. 32 f.; Glicksman 1983 b, S. 88; Stanley 1990, S. 85). Dabei nutzt man die bereits in Teil B, Kapitel 3.3.1.1 diskutierte charakteristische Unlöslichkeit der Carrageenane in hochkonzentrierten Alkoholen aus, die selbst Mischbarkeit mit Wasser aufweisen.

Dieser Vorgang hat folgenden physikalisch-chemischen Hintergrund: Als hydrophile Kolloide stabilisieren sich die Polysaccharid-Teilchen in Lösung vor allem durch Umhüllung mit Wasser-Molekülen. Bei Vermischung eines Carrageenan-Sols mit 2-Propanol tritt nun dadurch eine Schwächung dieser Wasser-Hülle ein, dass ihr im Zuge der Hydratation des Alkohols Lösungsmittel-Moleküle entzogen werden. Dies führt dazu, dass das Carrageenan als faserförmiges Präzipitat ausfällt, während die Verunreinigungen des Polysaccharid-Sols in Lösung bleiben (Firma Systems Bio-Industries 1987, S. 32).

Durch Fällung mit 2-Propanol isolierte Carrageenane weisen eine Reinheit und Qualität auf, die mit anderen Verfahren zur Isolierung des Algenpolysaccharids, wie z. B. der simplen Trommeltrocknung des aufkonzentrierten Filtrats, nicht zu erreichen ist (vgl. u. a. Baird 1994, S. 850; Glicksman 1983 b, S. 88; Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 225).

Werden Rotalgen mit hohen κ -Carrageenan-Gehalten für die Gewinnung genutzt, so kann man das Algenpolysaccharid alternativ zur 2-Propanol-Präzipitation auch durch Extrusion in konzentrierte Kaliumchlorid-Lösung ausfällen.

Um das Wasser aus dem resultierenden κ -Carrageenan-Gel zu entfernen, wird dieses zunächst ausgepresst und dann einem Gefrier-Tau-Zyklus unterzogen. Man bezeichnet dieses Verfahren daher auch als „Gel Press Technology“ (van den Velde/De Ruyter 2002, S. 261).

Aufbereitung des Rohcarrageenans

Das mit 2-Propanol ausgefällte Rohcarrageenan wird anschließend z. B. durch Zentrifugieren vom Präzipitationsbad abgetrennt (Firma Systems Bio-Industries 1987, S. 33) und durch Auspressen von der Restflüssigkeit befreit (Stanley 1990, S. 225). Aus der als Rückstand verbleibenden Alkohol-Wasser-Mischung trennt man das 2-Propanol destillativ ab, damit es zur Kosteneinsparung wieder in den Produktionsprozess eingebracht werden kann (van den Velde/De Ruyter 2002, S. 261).

Zur Beseitigung anhaftender Verunreinigungen wäscht man das isolierte Carrageenan-Präzipitat daraufhin mit 2-Propanol. Diese Operation hat gleichzeitig die Funktion, eine partielle Dehydratisierung des Rohcarrageenans herbeizuführen (Firma Systems Bio-Industries 1987, S. 32; Lewis/Stanley/Guist 1988, S. 225).

Durch Trocknen des aufbereiteten Polysaccharid-Niederschlags im Vakuum wird schließlich Reincarrageenan erhalten (Firma Systems Bio-Industries 1987, S. 32).

Verarbeitung des Reincarrageenans zum Handelsprodukt

Das Reincarrageenan wird durch Mahlen auf die gewünschte Korngröße gebracht, einer Chargenkontrolle unterzogen und bei Bedarf mit anderen Carrageenan-Fractionen vermischt (Firma Systems Bio-Industries 1987, S. 32). Letzteres geschieht aus dem Grunde, dass die Zusammensetzung aus Rotalgen gewonnener Carrageenane relativ starken natürlichen Veränderungen unterworfen ist. Um dennoch eine kontinuierliche Verwendungsmöglichkeit der Algenpolysaccharide für bestimmte Zwecke garantieren zu können, müssen die carrageenanproduzierenden Firmen daher Mischungen aus verschiedenen Chargen herstellen (Thomas 1997, S. 47).

Bevor die Carrageen-Produkte in den Handel kommen, werden sie noch durch Zufügen von Saccharose standardisiert, damit sie gleichbleibende Ergebnisse in einer Reihe von Funktionstests erzielen. Dazu gehören nach Stanley (1990, S. 86 f.) die Überprüfung

- der Viskosität einer wässrigen Lösung definierter Konzentration,
- der Gelstärke in Wasser und Milch,
- der milchstabilisierenden Wirkung.

3.4.3 Processed Eucheuma Seaweed (PES)

Unter der Bezeichnung „Processed Eucheuma Seaweed (PES)“⁶ kommen Produkte in den Handel, die sich von den in Kapitel 3.4.2 beschriebenen raffinierten Carrageenanen unterscheiden (Marinalg 2003 c, Firma Shemberg 2003 b; Firma Degussa Texturant Systems 2003; van den Velde/De Ruiten 2002, S. 248 f., 261):

Die Produktionsstätten für Processed Eucheuma Seaweed (PES) finden sich überwiegend auf den Philippinen. Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung werden ausschließlich *Eucheuma*-Spezies verwandt.

Zunächst behandelt man die Rotalgen bei 70 – 80 °C mit Kaliumhydroxid-Lösung, damit sich die biologischen Carrageenan-Vorläufer μ und ν in die gelierfähigen κ - und ι -Varianten umwandeln. Die Temperatur ist allerdings nicht hoch genug, um die in den Algen vorliegenden Carrageenane in Lösung zu bringen.

Das mit Kalilauge behandelte Produkt wird dann zerkleinert und zur Verhinderung unerwünschter Verfärbungen durch Photosynthesefarbstoffe gebleicht. Nach Waschen, Trocknen und Vermahlen schließt sich häufig noch eine Sterilisierung des gewonnenen Processed Eucheuma Seaweed an, um dessen mikrobiologische Qualität zu verbessern (van den Velde/de Ruiten 2002, S. 261).

Dadurch, dass bei der Herstellung von PES die in den herkömmlichen Verfahren praktizierte Abtrennung unlöslicher Bestandteile sowie die aus Reinigungszwecken durchgeführte Präzipitation des Carrageenans mit 2-Propanol oder KCl-Lösung entfallen, ist das Erzeugnis wesentlich kostengünstiger, aber auch stärker verunreinigt als raffinierte Carrageenane. Es weist daher eine Reihe Charakteristika auf, die für bestimmte Einsatzzwecke ungünstig sind. Dazu gehören vor allem (Firma Degussa Texturant Systems 2003):

- ein hoher Gehalt (8 – 15 %) an wasserunlöslichen Stoffen (v. a. Cellulose), durch den Trübungen im Endprodukt verursacht werden können,
- mögliche Kontamination durch Sand, Muschelschalen, Plastikrückstände etc.,
- eine braune Farbe (resultierend aus enthaltenen wasserlöslichen Verunreinigungen),
- ein nicht standardisiertes Sol- und Gelbildungsverhalten (Standardisierung und Qualitätssicherung entfallen oft aus Kostengründen).

⁶ Als Synonyme werden auch gebraucht: Philippine Natural Grade (PNG), Semi-Refined Carrageenan (SRC), Alternatively Refined Carrageenan (ARC), Alkali-Modified Flour (AMF) und Seaweed Flour.

3.4.4 Labormethoden zur Isolierung von Carrageenan

Bei der Umsetzung des großtechnischen Produktionsverfahrens in eine Labormethode zur Isolierung von Carrageenan aus Rotalgen erfolgte eine Orientierung an dem von Vandermeulen (1988, S. 164 – 167) beschriebenen Experiment zur Herstellung von Rohcarrageenan.

In diesem Versuch wird durch Kochen der Algen in einem Becherglas mit verdünnter Natronlauge zunächst das in den zerkleinerten Carrageenophyten enthaltene Polysaccharid-Derivat in Lösung gebracht wird. Nach Abtrennung der unlöslichen Algenbestandteile durch Filtrieren der noch heißen Extraktionsmischung über Baumwollstoff fällt man dann das im Filtrat gelöste Carrageenan durch Versetzen mit eisgekühltem 2-Propanol aus. Die Arbeitsvorschrift beinhaltet jedoch keine Vorschläge zur Reinigung und Trocknung des Präzipitats.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Modifikationen dieses Verfahrens konzipiert:

- eine **Labormethode zur Isolierung, Reinigung und Trocknung von Carrageenan**, in der experimentelle Teilschritte des Versuches von Vandermeulen (1988, S. 164 – 167) durch Verwendung anderer Geräte und Vorgehensweisen professioneller gestaltet wurden, um für eine stärkere Parallelität zum vorgestellten industriellen Verfahren zu sorgen (vgl. Experiment 41).
- ein **Schulversuch zur Isolierung und Untersuchung der Eigenschaften von Rohcarrageenan**, der es den Lernenden ermöglicht, mit möglichst geringem apparativem und zeitlichem Aufwand zentrale Schritte eines großtechnischen Verfahrens zur Carrageenan-Gewinnung nachzuvollziehen (vgl. Experiment 42).

Labormethode zur Isolierung, Reinigung und Trocknung von Carrageenan

Detailangaben zur Durchführung des entwickelten Versuches finden sich im Experimentellen Teil (vgl. Experiment 41). Im Folgenden soll nur die prinzipielle Vorgehensweise erläutert werden:

Zur Extraktion des Carrageenans erhitzt man die getrockneten und zerkleinerten Rotalgen mit verdünnter Natronlauge unter Rühren zum Sieden und hält das Reaktionsgemisch 15 Minuten auf dieser Temperatur.

Da die Extraktionsmischung in Abhängigkeit von der eingesetzten Algenart erst bei Temperaturen zwischen 125 und 130 °C siedet, wird unter Rückfluss gearbeitet. Auf diese Weise lassen sich Verluste des Lösungsmittels durch Verdunstung vermeiden, die eine Erhöhung der OH⁻-Konzentration im Reaktionsgemisch zur Folge hätten.

Tabelle 53 gibt Aufschluss über die optimierten Reaktionsbedingungen für die Extraktion von Carrageenan aus drei verschiedenen Rotalgen-Spezies.

Tab. 53: Optimierte Reaktionsbedingungen für die Extraktion von Carrageenan aus verschiedenen Rotalgen-Arten (Experiment 41).

Rotalgen-Spezies	Ölbad-Temperatur $\vartheta/^\circ\text{C}$	Zusammensetzung des Extraktionsansatzes		
		Algenmasse m/g	Einsatzform	Volumen an NaOH _(aq) (c = 0,01 mol/L) V/mL
<i>Chondrus crispus</i>	125	5	Mit elektrischer Kaffeemühle fein gemahlen	300
<i>Gigartina radula</i>	125	5	Mit elektrischer Kaffeemühle fein gemahlen	300
<i>Euचेuma cottonii</i>	130	5	Mit Schere gewürfelt (Kantenlänge: ca. 3 mm)	300

Die Abtrennung der unlöslichen Algenbestandteile erfolgt im entwickelten Experiment durch Absaugen der Extraktionsmischung über einen mit feinem Nesselstoff ausgelegten Büchnertrichter. Diese Operation lässt sich schneller und effizienter durchführen als das von Vandermeulen (1988, S. 165) vorgeschlagene Filtrieren über Baumwollstoff. Auf die im industriellen Rahmen praktizierte Verwendung von Kieselgur als Filtrierhilfsmittel wird verzichtet, da sich auch in umfangreichen Tests mit Glasfilternutschen, Filtertiegeln, Filtergeweben und Filterpapieren unterschiedlicher Porenweiten keine Versuchsanordnung finden ließ, die gleichzeitig eine Durchlässigkeit für das viskose Filtrat und ein effektives Zurückhalten der Diatomeenerde gewährleistet.

Die mit der Aufbereitung des Carrageenan-Sols verbundenen Schritte werden in Experiment 41 aus folgenden Gründen eingespart:

Zwar zeigte sich in Versuchsreihen, dass Aktivkohle in Analogie zum großtechnischen Prozess sehr effektiv zur Abtrennung der Photosynthesefarbstoffe einsetzbar ist, aber unter Laborbedingungen lässt sich nicht verhindern, dass das nach dieser Vorgehensweise hergestellte Carrageenan einen unerwünschten Grauschimmer aufweist, der vermutlich aus der Adsorption von Kohlepartikeln an den Polysaccharid-Fasern resultiert.

Die im großtechnischen Rahmen erforderliche Aufkonzentrierung des Filtrats erübrigt sich dadurch, dass die Zusammensetzung des Extraktionsansatzes so gewählt ist, dass das darin gelöste Carrageenan nach Abtrennung der festen Algenrückstände problemlos durch Zugabe zu auf $\vartheta \approx -10^\circ\text{C}$ gebrachtem 2-Propanol ausgefällt werden kann.

Das auf diese Weise erhaltene Rohcarrageenan wird im Laborversuch ebenfalls mit 2-Propanol gewaschen. Im Unterschied zum großtechnischen Verfahren schließt sich hier jedoch noch ein Lösungsmittelaustausch mit Aceton an, durch dessen Hilfe sich die Trocknungszeit im Vakuum beträchtlich verringern lässt.

Abbildung 73 zeigt das Ausgangsmaterial und das Produkt der in Experiment 41 vorgestellten Labormethode zur Isolierung, Reinigung und Trocknung von Carrageenan.

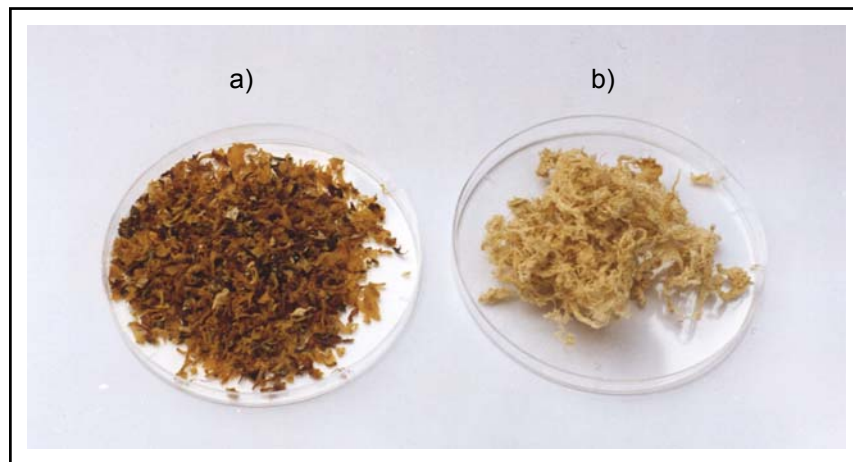


Abb. 73: Ergebnisse der Labormethode zur Isolierung, Reinigung und Trocknung von Carrageenan aus Rotalgen (Experiment 41): a) *Chondrus Crispus* (getrocknet und zerkleinert) und b) daraus gewonnenes Polysaccharid-Derivat .

Trotz der im Vergleich zum großtechnischen Prozess vorgenommenen Vereinfachungen sind die Versuchsergebnisse auch in quantitativer Hinsicht durchaus zufriedenstellend: So wurden z. B. aus 5 g *Chondrus crispus* 1,65 g und aus 5 g *Eucheuma cottonii* 1,44 g Reincarrageenan gewonnen. Die Carrageenan-Gehalte der eingesetzten Rotalgen berechnen sich daraus zu 33,0 % bzw. 28,7 % und liegen somit im Bereich des theoretisch zu erwartenden Wertes zwischen 25 und 70 % (Lüning 1985, S. 283; Voragen/Pilnik 1994, S. 41).

Schulversuch zur Isolierung und Untersuchung der Eigenschaften von Rohcarrageenan

In Experiment 42 werden ebenfalls wichtige Teile des in Teil B, Kapitel 3.4.2 beschriebenen großtechnischen Verfahrens zur Gewinnung von Carrageenan aus Rotalgen nachvollzogen. Besonderes Augenmerk lag hier jedoch darauf, den apparativen und zeitlichen Aufwand so zu reduzieren, dass die Durchführung des Versuchs im schulischen Rahmen möglich ist.

In Abwandlung der von Vandermeulen (1988, S. 164 – 167) vorgeschlagenen Arbeitsmethode isoliert man dabei auf die nachfolgend beschriebene Weise Rohcarrageenan aus *Chondrus crispus*. Für einen Schulversuch ist die Verwendung dieser Rotalgen-Art besonders günstig, weil sie in getrockneter und zerkleinerter Form als Hustentee-Zusatz in der Apotheke erhältlich ist.

Im Versuch werden die Rotalgen zunächst in der Hitze mit verdünnter Natronlauge behandelt, um alle darin enthaltenen Carrageenane ($\lambda > \kappa > \iota$) in Lösung zu bringen. Als Filtrations-Hilfsmittel zur Abtrennung unlöslicher Algen-Bestandteile kommt ein Teesieb aus Baumwolle zum Einsatz, dessen Porengöße sich als besonders günstig erwiesen hat, um einerseits feste Partikel zurückzuhalten, aber andererseits auch eine genügend große Durchflussgeschwindigkeit des hochviskosen Carrageenan-Sols zu gewährleisten.

Die im Filtrat gelösten Carrageenane können dann entweder durch Gelbildung mit kalter KCl-Lösung (κ, ι) oder durch Ausfällung mit eisgekühltem 2-Propanol isoliert werden (λ, κ, ι).

Um eine einfache und schnelle Durchführung des Versuches zu ermöglichen, werden im Gegensatz zu Experiment 41 keine weiteren Aufbereitungsschritte durchgeführt. Das erhaltene Rohcarrageenan ist daher noch mit Farbstoffen verunreinigt.

3.5 Ausgewählte Anwendungsmöglichkeiten

3.5.1 Übersicht

Bei praktisch allen existierenden Einsatzmöglichkeiten der Carrageenane nutzt man die charakteristischen Eigenschaften dieser Algenpolysaccharide aus, die bereits in Kapitel 3.3 des Theoretischen Teils diskutiert wurden. Dazu gehören insbesondere die verdickende und suspensionsstabilisierende Wirkung der κ -, ι - und λ -Carrageenane sowie die Gelbildungsfähigkeit der κ - und ι -Varianten. In Tabelle 54 werden wichtige Anwendungen der Carrageenane im Alltagsleben zusammengestellt.

Tab. 54: Alltagsrelevante Einsatzzwecke der Carrageenane (Glicksman 1983 b, S. 96, 106; Glicksman 1987, S. 41; Lembi/Waaland 1988, S. 216 ff.; Lüning 1985, S. 290; Thomas 1997, S. 56 ff.; Voragen/Pilnik 1994, S. 23, 44).

Einsatzbereiche	Ausgenutzte Eigenschaften
Lebensmittelindustrie <u>Produkte auf Wasserbasis:</u> Tortenguss Instant-Götterspeise Kalorienreduzierte Gelees Fruchtgummis ----- Fruchtsaftgetränke Sirupe Salatdressings Soßen	Gelbildung Verdickung, Stabilisierung
<u>Milchprodukte:</u> Instant-Desserts und Puddings Dessertsoßen Sahne Joghurt Kakaogetränke	Gelbildung, Stabilisierung
Kosmetik- und Pharmaindustrie Salben, Cremes und Lotionen Shampoo Zahnpasta	Verdickung, Stabilisierung

Wie aus Tabelle 54 ersichtlich ist, stellt die Lebensmittelindustrie den Hauptanwendungsbereich der Carrageenane dar. Hier werden mindestens 4/5 des jährlich weltweit aus Rotalgen gewonnenen Polysaccharids eingesetzt (Voragen/Pilnik 1994, S. 44).

Bei den Nahrungsmittelanwendungen unterscheidet man zwischen Produkten auf Wasser- und auf Milchbasis: Während in ersteren nur die sol- und gelbildenden Fähigkeiten sowie die emulsions- und suspensionsstabilisierenden Eigenschaften des Carrageenans zum Tragen kommen, wird in letzteren auch die spezifische Interaktion von Carrageenan mit bestimmten Milchproteinen ausgenutzt (vgl. Kapitel 3.5.2.2 des Theoretischen Teils). Einsatzmöglichkeiten des Carrageenans außerhalb des Nahrungsmittelsektors spielen kommerziell nur eine untergeordnete Rolle, aber einige wichtige Beispiele aus der Kosmetik- und Pharmaindustrie sind in Tabelle 54 aufgeführt.

In Bezug auf die Anwendungen des Carrageenans verfolgt die vorliegende Arbeit zwei grundlegende Ziele:

Zum einen sollen Experimente für den Chemieunterricht konzipiert werden, die bereits existierende alltagsrelevante Einsatzmöglichkeiten dieser Algenpolysaccharide auf einfache, aber aussagekräftige Weise veranschaulichen. Da die Nahrungsmittel-Anwendungen von Carrageenanen eine wichtige Rolle für unser tägliches Leben spielen und auch industriell mit Abstand am bedeutendsten sind, erfolgt eine Einschränkung auf diesen Bereich (vgl. Kapitel 3.5.2). Einige der zu diesem Themenkomplexes gehörenden Versuche wurden bereits veröffentlicht (Marburger/Gerstner 2000 b, S. 31 – 39; Marburger 2002 a, S. 30 – 31).

Zum anderen setzt sich die Arbeit mit potentiellen neuen Einsatzmöglichkeiten der Polysaccharid-Derivate für chemische Zwecke auseinander. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Untersuchungen werden in Kapitel 3.5.3 des Theoretischen Teils beschrieben.

3.5.2 Lebensmittelindustrie

3.5.2.1 Lebensmittelrechtliche und toxikologische Beurteilung

Carrageenane stellen keine Nahrungsmittel im eigentlichen Sinne dar⁷, sondern werden Lebensmittelerzeugnissen aus technologischen Gründen zugefügt. Die aus Rotalgen gewonnenen Polysaccharid-Derivate gehören somit zu den zulassungs- und kennzeichnungspflichtigen Lebensmittelzusatzstoffen. Bei Präsenz von Carrageenan in Fertigprodukten sind in der Liste der Inhaltsstoffe der Substanzname (im industriellen Bereich oft

⁷ Die zur Standardisierung der Algenpolysaccharide verwandte Saccharose verfügt allerdings über einen Energiegehalt.

nur „Carrageen“) oder die nach EU-Recht gültige Nummer E 407 sowie der Verwendungszweck anzugeben (Falbe/Regitz 1995c, S. 2471 f.; Kuhnert/Bixler 1993, S. 149).

Auch Processed Eucheuma Seaweed (PES) (vgl. Theoretischer Teil, Kapitel 3.4.3) darf als Lebensmittelzusatzstoff eingesetzt werden. Nach EU-Gesetzgebung wird es jedoch durch Zuteilung einer gesonderten E-Nummer (E 407 a) von raffinierten Carrageenanen unterschieden (Marinalg 2003 c; ZZuV 1998 a). In Kanada und den USA erfolgt diese Differenzierung seit 1990 nicht mehr: Hier darf für beide Varianten die Bezeichnung „Carrageenan“ verwandt werden (Marinalg 2003 c).

Carrageenane leisten keinen Beitrag zum Nährwert der Lebensmittel, in denen sie enthalten sind. Das liegt darin begründet, dass diese Polysaccharid-Derivate – sofern ihre Molmassen 100.000 g/mol übersteigen – nach oraler Aufnahme vom menschlichen Körper nicht enzymatisch abgebaut und resorbiert werden können (Steinegger/Hänsel 1992, S. S. 137).

Laut einer aktuellen Einschätzung des Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) der World Health Organization (WHO) und der Food and Agriculture Organization (FAO) sind Carrageenane als gesundheitlich unbedenklich anzusehen. Aufgrund dieser Tatsache wurden den Polysaccharid-Derivaten aus Rotalgen unbegrenzte ADI-Werte⁸ zugeteilt (Marinalg 2003 d).

Eine Übersichtsstudie der amerikanischen Medizinerin Tobacman (2001, S. 983 – 994), in der 45 Einzelstudien berücksichtigt wurden, stellt die Harmlosigkeit der Algenpolysaccharide jedoch in Frage:

In Tierversuchen haben sich Carrageenane mit niedrigen molekularen Massen als cancerogen erwiesen (Tobacman 2001, S. 992). Für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie wird zwar der Einsatz von hochpolymeren Substanzen ($M \geq 100.000$ g/mol) empfohlen, eine eindeutige Reglementierung existiert aber diesbezüglich nicht (Tobacman 2001, S. 983). So können stark abgebaute Carrageenane mit der Nahrung in den Organismus gelangen, die Schleimhäute des Magen-Darm-Traktes schädigen und zu entzündlichen und unter Umständen auch bösartigen Veränderungen führen (Tobacman 2001, S. 992).

Wie die Studie des Weiteren zeigte, kann aber auch die Aufnahme von Carrageenanen mit großen molekularen Massen gesundheitliche Gefahren mit sich bringen. Dies liegt darin begründet, dass diese Algenpolysaccharide unter den sauren Bedingungen im Magen hydrolysiert, d. h. in kleinere Einheiten gespalten werden (Tobacman 2001, 992).

⁸ Zur Definition der Abkürzung „ADI“ vgl. Kapitel 2.6.2.1 des Theoretischen Teils.

3.5.2.2 Nutzung

Wie bereits eingangs angedeutet, unterscheidet man im Zusammenhang mit der Verwendung von Carrageenanan als Lebensmittelzusatzstoffe zwei Hauptkategorien von Einsatzbereichen – **wässrige Systeme** und **Milchprodukte**. Diese sollen im Folgenden näher betrachtet und anhand ausgewählter experimenteller Beispiele veranschaulicht werden.

Wässrige Systeme

In Abbildung 74 sind überblickshalber wichtige Anwendungen von Carrageenanan in Lebensmitteln auf Wasserbasis zusammengestellt. Es wird deutlich, dass bei allen Produkten die funktionellen Eigenschaften der Algenpolysaccharide zum Tragen kommen, die bereits in Kapitel 3.3 des Theoretischen Teils diskutiert wurden.

Eigenschaft	Bildung viskoser Sole Emulsions- und Suspensions- Stabilisierung κ, ι und λ ($w = 0,1 - 0,5 \%$)	Gelbildung mit Kalium- und Calcium-Kationen κ und ι ($w = 0,5 - 1 \%$)
Verwendungszweck	Verdickungsmittel Stabilisator	Geliermittel
Einsatzbeispiele	<ul style="list-style-type: none"> • Sirupe • Fruchtsaftgetränke • Salatdressings • Relishes • Tomatensoßen 	<ul style="list-style-type: none"> • Tortenguss • Dessertgele z. B. Instant-Götterspeise • Kalorienreduzierte Gelees • Fruchtgummis

Abb. 74: Carrageenane in Lebensmittelerzeugnissen auf Wasserbasis: Funktionen der Polysaccharide und Beispiele für Produkte, in denen sie verwandt werden (Voragen/Pilnik 1994, S. 23, 44; Glicksman 1983 b, S. 96, 106; Glicksman 1987, S. 41; Thomas 1997, S. 56 ff.).

Da in Wasser dispergierte Carrageenane durch die Bildung hochviskoser Sole verdickend wirken und zudem emulsions- und suspensionsstabilisierende Eigenschaften haben, werden sie als Verdickungsmittel und Stabilisatoren in Sirups und Fruchtsaftgetränken sowie in Salatdressings, Relishes und Tomatensoßen für Spaghetti, Pizza und Grilladen eingesetzt (Glicksman 1983 b, S. 96, 106; Glicksman 1987, S. 41; Thomas 1997, S. 57).

Wie bereits in Teil B, Kapitel 3.3.3 erläutert, verhindern Carrageenane in diesen Produkten durch Erhöhung der Viskosität der wässrigen Phase sowie durch Bildung eines elektrisch geladenen Schutzfilmes um die emulgierten Tröpfchen bzw. suspendierten Partikel die Separation der verschiedenen Bestandteile. So bewirkt z. B. die Präsenz von Carra-

geenanen in Salatdressings, dass das enthaltene Öl und die zugesetzten Kräuter nicht auf der wässrigen Phase aufschwimmen. Des Weiteren wirkt sich das Algenpolysaccharid günstig auf die sensorischen Eigenschaften der genannten Produkte aus (Glicksman 1983 b, S. 106).

Für die Verwendung als Verdickungsmittel und Stabilisatoren kommen sowohl das nicht gelbildungsfähige λ -Carrageenan als auch die ab einem Massengehalt von etwa 0,5 % gelierenden κ - und ι -Varianten in Frage. Letztere werden allerdings in so geringen Mengen eingesetzt ($w \approx 0,1 - 0,5$ %), dass sich keine oder nur sehr schwache Gele ausbilden (Firma Copenhagen Pectin 1996 a, S. 9; Glicksman 1983 b, S. 106; Thomas 1997, S. 57). Es gibt allerdings auch Nahrungsmittel auf Wasserbasis, für deren Konsistenz gelierende Wirkung von κ - und ι -Carrageenan entscheidend ist:

Dazu gehören unter anderem Tortenguss, Dessertgele (z. B. Instant-Götterspeise) und kalorienreduzierte Gelees. Abbildung 75 zeigt einige Beispielprodukte, die im Supermarkt erhältlich sind.

Damit die genannten Erzeugnisse über eine ausreichende Gelfestigkeit verfügen, liegt hier der Massenanteil an Carrageenan mit $w \approx 0,5 - 1,0$ % deutlich höher als bei den Anwendungen des Algenpolysaccharids als Verdickungsmittel und Stabilisator.

Reine κ -Carrageenan-Gele sind sehr fest, spröde und zeigen Synäreseerscheinungen, d. h. sie schrumpfen durch Austritt von Wasser-Molekülen aus dem Polysaccharid-



Abb. 75: Carrageenane als Geliermittel in Tortenguss und Instant-Götterspeise – Beispielprodukte.

Netzwerk. Bei den Gelen der ι -Variante tritt dieser Effekt hingegen nicht auf. Sie sind außerdem elastischer und besser verformbar als κ -Carrageenan-Gele und weisen Gefrier-Tau-Stabilität auf. Aufgrund ihrer geringen Festigkeit sind reine ι -Carrageenan-Gele allerdings nicht für alle Anwendungen geeignet. Um Lebensmitteln ihre gewünschte Textur zu verleihen, setzt man daher häufig Mischungen von κ - und ι -Carrageenanen als Geliermittel ein. Auch die Kombination von κ -Carrageenan mit Johannisbrotkernmehl, einem selbst nicht gelbildenden Galactomannan, hat sich bewährt, um eine Konsistenz zu erzielen, die der von Gelatine-Gelen ähnelt (Firma Copenhagen Pectin 1996 a, S. 11; Thomas 1997, S. 54).

Im Zuge der Suche nach pflanzlichen Ersatzgelmitteln für Gelatine, die insbesondere wegen der in den neunziger Jahren aufkommenden Angst der Verbraucher vor BSE von den Zusatzstoff-Produzenten forciert wurde, haben sich auch neue potentielle Anwendungen für Carrageenane ergeben. So versucht man seit einiger Zeit, das Algenpolysaccharid als Gelbildner in Süßwaren mit gummiartiger Konsistenz (z. B. Gummibärchen, Frucht- und Weingummis), einzusetzen, die traditionell mit Gelatine zubereitet wurden (Carr/Sufferling/Poppe 1995, S. 44; Firma CP Kelco a; Grøndal 2000; van Haarlem 2001): Ein besonderes Problem bei der Erarbeitung alternativer Rezepturen für solche Süßigkeiten besteht darin, mit Carrageenanen die für Gelatine-Gele charakteristische Kombination aus Bissfestigkeit und Elastizität zu erzielen. Diese besondere Textur lässt sich auch mit anderen pflanzlichen Gelmitteln, wie z. B. Pectin, Agar und Stärke, kaum imitieren. Von der Firma CP Kelco wurde aber eine Serie von Spezialcarrageenanen konfektioniert (Handelsname: Genutine™), mit denen sich die für Gelatine typischen Geleigenschaften weitgehend nachstellen lassen (Firma CP Kelco a; Grøndal 2000). In Abbildung 76 werden die sensorischen Profile der Gele von konventionellem ι -Carrageenan, Genutine™ und Gelatine einander gegenübergestellt:

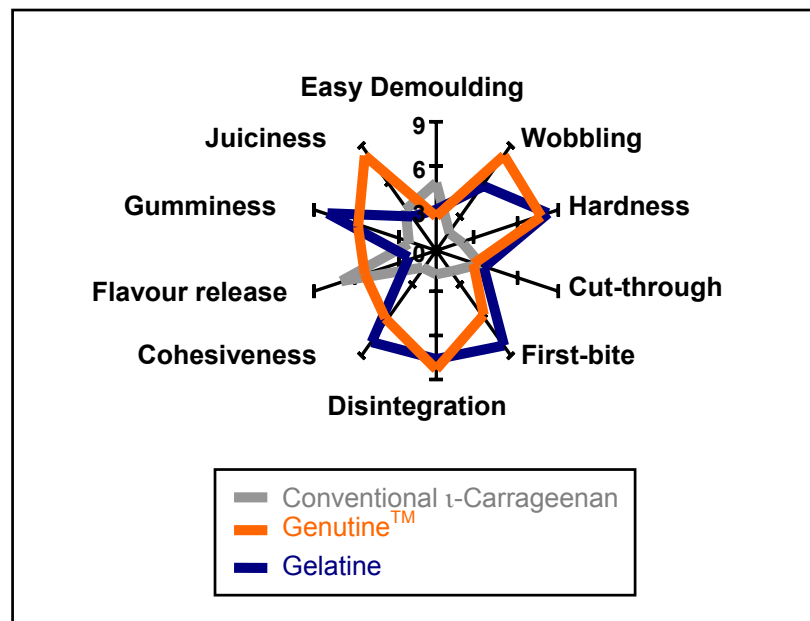


Abb. 76: Sensorische Profile der Gele von konventionellem ι -Carrageenan, Genutine™ und Gelatine im Vergleich (Grøndal 2000; verändert).

Wie ersichtlich ist, erreicht Genutine™ in vielen Bereichen praktisch gleiche Werte wie Gelatine. Dies betrifft insbesondere die Härte, Schnittfestigkeit und Zerfallseigenschaften der entsprechenden Gele. Aber auch in Bezug auf gummiartige Textur, Gelzusammenhalt und Bissfestigkeit ähnelt das Spezialpolysaccharid in seinen Eigenschaften eher Gelatine als herkömmlichem ι -Carrageenan.

Im Vergleich zu gelatinehaltigen Süßigkeiten mit gummiartiger Textur weisen mit Genutine™ hergestellte Produkte sogar noch eine Reihe von Vorzügen bezüglich Herstellung und Haltbarkeit auf (Firma CP Kelco a; Grøndal 2000):

- Für das Ausgießen der Gummimasse können anstelle von Stärkebetten Plastik- oder Metallformen verwandt werden.
- Die Aushärtung der Gelmasse erfolgt wesentlich schneller als bei Gelatine.
- Die Hitzestabilität carrageenanhaltiger Erzeugnisse ist wesentlich größer als die von traditionellen Gummibärchen.

Trotz der guten Eignung von Genutine™ als Geliermittel für die oben beschriebenen Süßwaren wird es noch einige Zeit dauern, bis das Produkt vollständig technisch ausgereift ist und sich auf dem Markt etablieren kann.

Experimentelle Veranschaulichung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Entwicklung von drei Versuchen, mit denen sich auf einfache Weise die Verwendung von Carrageenanen in Lebensmitteln auf Wasserbasis untersuchen lässt:

(1) Carrageenan als Emulsions- und Suspensionsstabilisator

Experiment 43 hat das Ziel, die stabilisierende Wirkung von λ -Carrageenan auf ein selbst zubereitetes Salatdressing mit Öl und Kräutern zu veranschaulichen. Dazu wird im Reagenzglas λ -Carrageenan-Lösung ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) durch Schütteln mit einer Mischung aus Speiseöl und in Wasser gequollenen, gefriergetrockneten Kräutern versetzt. Als Vergleichsprobe für das Algenpolysaccharid-Sol verwendet man ein äquivalentes Volumen entionisierten Wassers.

In dem mit λ -Carrageenan stabilisierten Salatdressing ist auch nach 20 – 30 Minuten noch keine Entmischung zu beobachten: Öl-Tröpfchen und Salatkräuter liegen gleichmäßig verteilt in der wässrigen Phase vor. Im Gegensatz dazu setzt in dem Ansatz mit entionisiertem Wasser schon nach 30 – 60 Sekunden die Phasentrennung ein. Nach etwa fünf Minuten hat sich die Öl-Phase, die einen Großteil der suspendierten Kräuter enthält, sehr deutlich von der Wasser-Phase getrennt. Die grünliche Farbe der Wasser-Phase wird durch die aus den Kräutern freigesetzten Farbstoffe verursacht.

(2) *Nachweis von Carrageenan in Salatdressings, Tortenguss und Instant-Götterspeise*
In Experiment 44 wird eine Methode beschrieben, mit deren Hilfe man Carrageenane in Nahrungsmittelerzeugnissen auf Wasserbasis qualitativ mit Methylenblau-Lösung nachweisen kann. Dabei handelt es sich um eine typische Testreaktion auf dieses Algenpolysaccharid, die insbesondere in der Lebensmittelanalytik Anwendung findet (Voragen/Pilnik 1994, S. 44; Soedjack 1994, S. 4514 – 4518).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Verfahren entwickelt, mit denen sich die enthaltenen Carrageenane möglichst einfach aus den entsprechenden Lebensmitteln isolieren lassen (Versuchsteile a) und c)) bzw. mit denen man die algenpolysaccharidhaltigen Produkte so aufbereiten kann, dass eine Abtrennung des Carrageenans nicht nötig ist (Versuchsteil b)).

In Experiment 44 a) wird ein Salatdressing mit Kräutern untersucht, in dem das Polysaccharid-Derivat als Verdickungsmittel und Stabilisator enthalten ist. Abbildung 77 zeigt zwei Beispiele für carrageenanhaltige Produkte, die im Supermarkt erhältlich sind.

Dazu isoliert man das dem Dressing zugesetzte Algenpolysaccharid zunächst durch Ausfällung mit 2-Propanol. Das dabei als Produkt anfallende faserige Präzipitat wird anschließend abgesaugt, mit dem genannten Alkohol sowie mit Aceton gewaschen und in einem evakuierten Exsikkator bis zur Massenkonstanz getrocknet. Durch Auflösen der Trockensubstanz in entionisiertem Wasser stellt man daraufhin ein Carrageenan-Sol her. Das im Salatdressing ebenfalls enthaltene Johannisbrotkernmehl fällt unter den oben beschriebenen Bedingungen auch aus. Als ungeladenes Galactomannan stört es allerdings die Nachweisreaktion auf Carrageenan nicht, da der kationische Farbstoff Methylenblau nur mit Substanzen reagiert, die über Polyanion-Charakter verfügen.

In Experiment 44 a) wird zusätzlich eine noch stärker apparativ vereinfachte Versuchsvariante beschrieben, bei der man ohne Membranpumpe und Exsikkator auskommt. Hier wird das Präzipitat lediglich in einem Mehrwegkaffeefilter mit 2-Propanol und Aceton gewaschen und kurze Zeit an der Luft getrocknet, bevor man es in entionisiertem Wasser auflöst. Da die experimentellen Ergebnisse mit der letztgenannten Methode ähnlich gut sind, ist sie aufgrund ihres geringen Geräte- und Zeitaufwandes besonders gut für schulische Zwecke geeignet.



Abb. 77: Salatdressings mit Carrageenan: Firma Hengstenberg (links) und Firma Kühne (rechts).

Versetzt man nun in drei Reagenzgläsern jeweils gleiche Volumina

- einer Lösung des aus dem Salatdressing isolierten Carrageenans,
- einer als Blindprobe dienenden ι -Carrageenan-Lösung ($\rho^* \approx 2 \text{ g/L}$) und
- entionisierten Wassers

mit Methyleneblau-Lösung ($\rho^* = 0,08 \text{ g/L}$), so ist in den beiden Carrageenan-Solen das Auftreten vergleichbarer blauvioletter Färbungen zu beobachten. Dahingegen weist die Probe des entionisierten Wassers lediglich die typische türkisblaue Farbe einer verdünnten wässrigen Methyleneblau-Lösung auf.

Die Ergebnisse des Teilversuchs 44 a) sind in Abbildung 78 zusammenfassend dargestellt:

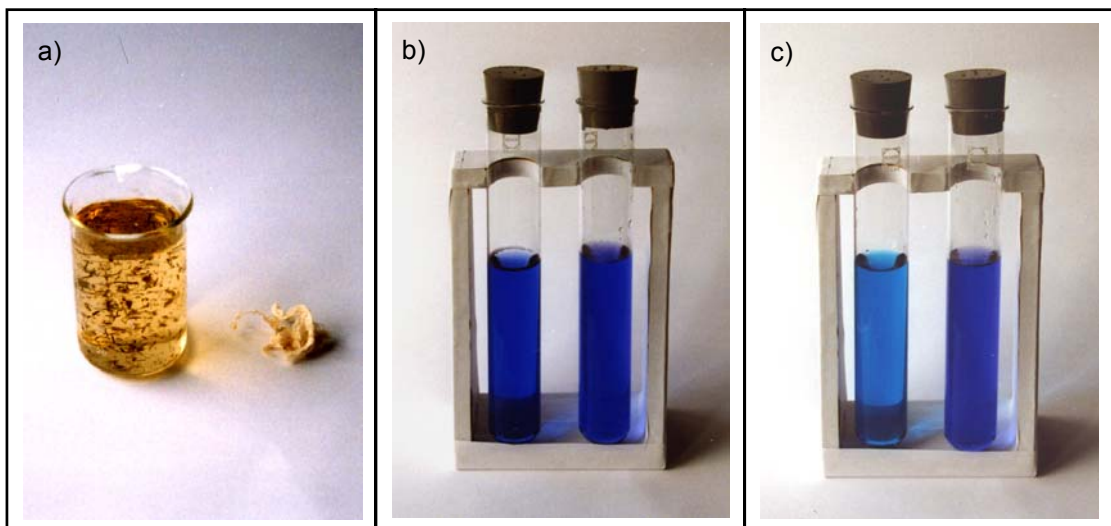
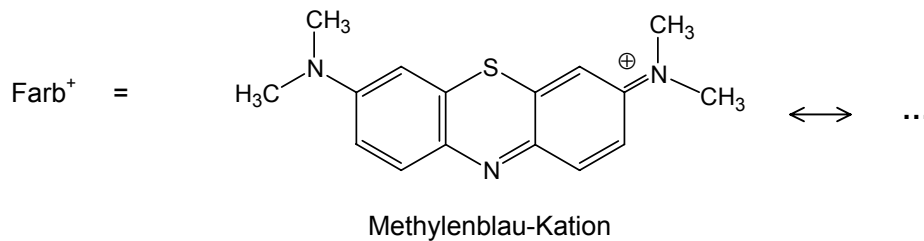
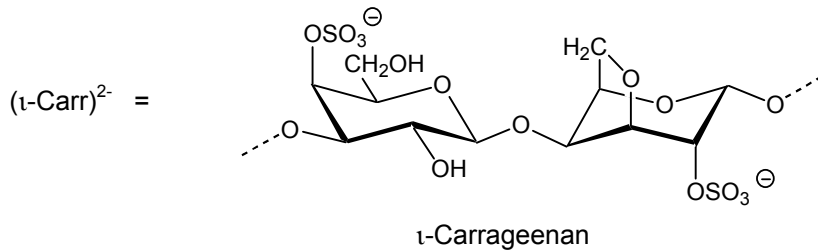
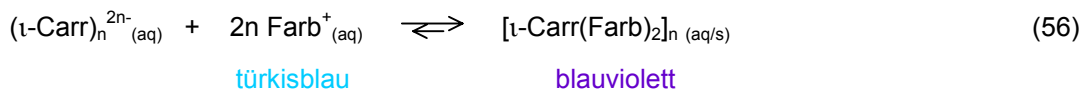


Abb. 78: Nachweis des in Salatdressing enthaltenen Carrageenans (Experiment 44 a):
a) aus 100 g „Kräuteressig“ der Firma Kühne isolierte Trockensubstanz ($m = 0,263 \text{ g}$);
b) charakteristische blauviolette Färbungen, die nach Zusatz von Methyleneblau-Lösung auftreten: als Blindprobe eingesetztes ι -Carrageenan-Sol (links) und Carrageenan-Lösung mit dem aus der SalatsöÙe isolierten Polysaccharid-Derivat (rechts);
c) nach Versetzen mit Methyleneblau-Lösung in der Probe mit entionisiertem Wasser beobachtbare türkisblaue Farbe (links) und positiv ausgefallene Nachweisreaktion in der Lösung des aus dem „Kräuteressig“ ausgefällten Carrageenans (rechts) im Vergleich.

Mit der beschriebenen Nachweisreaktion sind die nachfolgend diskutierten Vorgänge verknüpft:

Die Carrageenan-Polyanionen bilden mit den Kationen des Methyleneblau-Farbstoffes einen blauvioletten, in geringer Konzentration wasserlöslichen Komplex (Soedjack 1994, S. 4517). Diese Reaktion ist stöchiometrisch und erfolgt formal nach dem in Gleichung (56) angegebenen Schema.



Die Absorptionsmaxima des Methylenblau-Farbstoffes liegen bei $\lambda_{\text{max}1} = 610 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{max}2} = 664 \text{ nm}$. Für den blauvioletten Carrageenan-Methylenblau-Komplex wurde experimentell $\lambda_{\text{max}} = 559 \text{ nm}$ gefunden (Soedjack 1994, S. 4517). Bei der Komplexbildung tritt folglich eine hypsochrome Verschiebung ein.

Für die Formulierung der Reaktion wurde t-Carrageenan gewählt, da diese Variante des Rotalgenpolysaccharids typischerweise in Salatdressings zum Einsatz kommt (Glicksman 1983 b, S. 96). Es sei aber darauf hingewiesen, dass auch die beiden anderen Carrageenan-Typen mit Methylenblau unter Komplexbildung reagieren. Aufgrund der unterschiedlichen Sulfat-Gehalte der κ -, ι - und λ -Varianten sind allerdings leichte Unterschiede in den auftretenden blauvioletten Farbtönen zu beobachten.

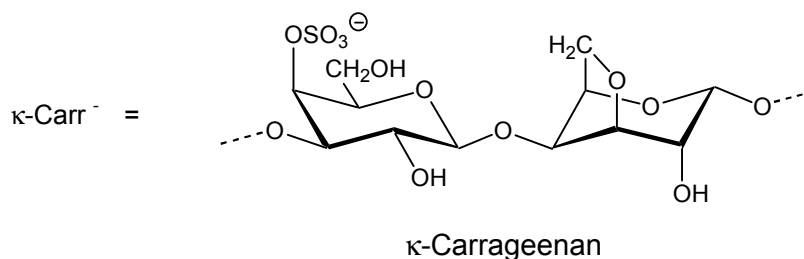
In Experiment 44 b) wird das in Tortenguss-Pulver als Geliermittel enthaltene Carrageenan durch Komplexbildung mit Methylenblau nachgewiesen. Verwendet man hierzu ein Handelserzeugnis, das neben dem Algenpolysaccharid keine weiteren Zusatzstoffe mit Polyanion-Charakter enthält, so kann für den Nachweis eine stark verdünnte Lösung des Tortenguss-Pulvers ohne weitere Aufbereitungsschritte eingesetzt werden.

Diese Bedingung muss aus dem Grunde erfüllt sein, dass auch andere Polyanionen Komplexe mit Methylenblau-Kationen bilden können. Deren Absorptionsmaxima unterscheiden sich zwar von denen des Carrageenan-Methylenblau-Komplexes, aber es kann dennoch zu Störungen der Nachweisreaktion durch Farbverfälschungen kommen.

Da Tortenguss in der Regel κ -Carrageen als Geliemittel enthält (Glicksman 1983 b, S. 96), werden in Versuchsteil b) Lösungen dieser Algenpolysaccharid-Variante als Vergleichsproben verwandt:

Neben einem κ -Carrageenan-Sol ($\rho^* \approx 2$ g/L) wird auch noch eine κ -Carrageenan-Lösung ($\rho^* \approx 2$ g/L) als Blindprobe eingesetzt, die zusätzlich Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat in einer Massenkonzentration von $\rho^* \approx 3$ g/L enthält. Diese Vorgehensweise liegt darin begründet, dass Tortenguss-Pulver häufig Kaliumhydrogentartrat als Säuerungsmittel enthält, das die Farbe des entstehenden Carrageenan-Methylenblau-Komplexes beeinflusst. Je nach Kaliumtartrat-Gehalt des eingesetzten Handelserzeugnisses entspricht die bei der Nachweisreaktion beobachtete Farbe eher der des κ -Carrageenan-Sols ohne bzw. mit zugesetztem Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat.

Die mit dem Carrageenan-Nachweis in Tortenguss verbundene Reaktion entspricht prinzipiell der in Gleichung (56) dargestellten. Zu berücksichtigen ist lediglich, dass κ -Carrageenan 1:1-Komplexe mit Methylenblau bildet, da diese Variante des Algenpolysaccharids nur halb so viele Sulfat-Gruppen wie ι -Carrageenan enthält. Dies wird in Gleichung (57) deutlich:



In Experiment 44 c) sollen Carrageenane aus Instant-Götterspeise isoliert und mit Methylenblau-Lösung nachgewiesen werden. Dabei hat sich in Versuchsreihen folgende Vorgehensweise als günstig erwiesen:

Zunächst wird eine verdünnte Lösung des Dessert-Pulvers in siedendem Wasser angesetzt. Durch Zugabe des heißen Götterspeisen-Sols zu eisgekühlter KCl-Lösung ($\rho^* = 150$ g/L) fällt man anschließend die darin enthaltenen κ - und ι -Carrageenane als Kalium-Gele aus. Die resultierenden Gel-Partikel werden abfiltriert und durch Spülen mit Ethanol (1 : 1) weitgehend von Salzen, Farb- und Aromastoffen befreit. Nach weiterer Behandlung mit Ethanol und Aceton trocknet man den gereinigten Carrageenan-Rückstand kurze Zeit an der Luft und löst ihn in heißem entionisiertem Wasser.

Mit dem erhaltenen Carrageenan-Sol wird anschließend die Methyleneblau-Reaktion durchgeführt. Da Instant-Götterspeisen in der Regel Mischungen aus κ - und ι -Carrageenanen als Geliermittel enthalten (Glicksman 1983 b, S. 96), lässt sich als Vergleichsprobe eine Lösung von einer dieser beiden Algenpolysaccharid-Varianten einsetzen.

Instant-Götterspeisen, die neben Carrageenanen noch Johannisbrotkernmehl enthalten, sollten für den Versuch nicht verwandt werden. Bei diesen Produkten hat sich die Befreiung des Carrageenan-Gels von Farbstoffen als sehr schwierig erwiesen.

(3) *Fruchtgummis auf Carrageenan-Basis*

Durchgeführt wurden außerdem Versuchsreihen zur Verwendbarkeit von Carrageenanen als Geliermittel für Gummibärchen. In der Technik erfolgt die Herstellung dieser Süßigkeiten dadurch, dass man unter Erhitzen und Einsatz eines Hochgeschwindigkeitsmixers aus den in Tabelle 55 angegebenen Komponenten eine Lösung herstellt, diese noch heiß in Formen ausgießt und bis zum Erreichen der gewünschten Gelfestigkeit stehen lässt (Firma CP Kelco a; Grøndal 2000).

Tab. 55: Typische Zusammensetzung der Ausgangsmischung für carrageenhaltige Fruchtgummis (Firma CP Kelco b; Grøndal 2000).

Komponente	Massen- gehalt (%)
Glucose-Sirup (DE 60)	75,00
Genutine™	2,50
Wasser	15,00
Natriumcitrat	1,04
Saccharose	15,00
Citronensäure-Lösung (w = 0,50)	2,00
Aromen und Farbstoffe	optional

Als Grundstoff für die Gummimasse wird Glucose-Sirup eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine wässrige Lösung von D-Glucose, Maltose und verschiedenen Oligosacchariden aus Glucose-Bausteinen, die durch saure oder enzymatische Hydrolyse von Stärke hergestellt wird. Der Hydrolysegrad des Sirups wird durch den so genannten DE-Wert (engl. „dextrose equivalents“) quantifiziert. Unter Verwendung von Glucose als Bezugssubstanz gibt dieser Wert an, wie viel Massenprozent reduzierende Zucker im Produkt enthalten sind (Falbe/Regitz 1995 b, S. 1603).

Für die Zubereitung der Gummibärchen löst man zunächst das Spezialcarrageenan in dem Glucosesirup, der zur Verringerung der Viskosität zuvor auf 60 – 80 °C erwärmt wurde. Obwohl Genutine™ über eine deutlich verbesserte Löslichkeit in Medien mit hohem Zucker-Gehalten verfügt als herkömmliche Rotalgenpolysaccharide, ist hier durch Spezialvorrichtungen für eine besonders feine Dispersion der Carrageenan-Partikel sowie eine hohe Rührgeschwindigkeit Sorge zu tragen.

Im nächsten Arbeitsschritt werden nacheinander das in Wasser gelöste Natriumcitrat sowie die Saccharose zu der Mischung hinzugefügt. Nachdem man die Gummimasse auf Siedetemperatur gebracht hat, wird noch so lange weiter erhitzt, bis der Gesamtgehalt an löslichen Feststoffen 79 % beträgt. Abschließend werden die Citronensäure-Lösung und

nach Bedarf auch Aroma- und Farbstoffe untergerührt (Firma CP Kelco a; Firma CP Kelco b; Grøndal 2000).

In der Arbeit wurde versucht, das beschriebene Verfahren in eine einfache Labormethode umzusetzen. In den Experimenten traten allerdings bei Verwendung des Glucose-Sirups „C*Sweet M 01656“ (DE = 53; Firma Cerestar) und dem von der Firma CP Kelco zur Verfügung gestellten „Genutine™“ Probleme mit der Auflösung des Carrageenans auf. Grund dafür war vermutlich, dass anstelle der technischen Spezialvorrichtungen aus Gründen der Vereinfachung ein heizbarer Magnetrührer zum Erhitzen und Vermischen des Ansatzes eingesetzt werden musste. Zudem stellten weitere Faktoren, wie z. B. die für den schulischen Zeitrahmen relativ langen Gelierzeiten der Gummibärchen sowie die aufwändige Beschaffung des Glucose-Sirups und des Carrageenans aus dem Entwicklungsbereich der Firma CP Kelco, die Realisierung dieses Versuches im Chemieunterricht in Frage.

Mit Experiment 45 wurde daher eine stärker didaktisch reduzierte Vorgehensweise konzipiert, mit der sich in der Schule carrageenanhaltige Fruchtgummis herstellen lassen:

Als Ersatz für den oben angesprochenen Glukose-Sirup der Firma Cerestar verwendet man hier einen deutlich weniger viskosen Getränke-Grundstoff mit Waldmeister-Geschmack, der im Supermarkt erhältlich ist. In diesem Waldmeister-Sirup werden nach leicht abgewandelter technischer Vorschrift die in Tabelle 55 aufgeführten Komponenten unter Erwärmen und Rühren gelöst.

Als Geliermittel hat sich in Versuchsreihen ein nicht standardisiertes κ -Carrageenan (Firma Eurogum) bewährt, das durch gute Löslichkeitseigenschaften und eine für den schulischen Rahmen erforderliche schnelle Gelierzeit besticht.

Die fertige Grundmasse wird zur Aushärtung in Eiswürfelformen mit Tiermotiven gegossen. Die auf diese Weise hergestellten Fruchtgummis verfügen zwar über eine hohe Gelfestigkeit, weisen aber Synäreseerscheinungen auf. Insbesondere aus diesem Grund kommt κ -Carrageenan auch nicht für technische Einsatzzwecke in Frage.

Im Hinblick auf den Chemieunterricht spielt dies allerdings nur eine untergeordnete Rolle. Folglich ist Experiment 45 durchaus geeignet, um in der Schule auf modellhafte Weise die Anwendbarkeit von Carrageenanen als Geliermittel für Süßwaren mit gummiartiger Textur zu veranschaulichen.

Anwendung von Carrageenan in Milchprodukten

Bei der Verwendung von Carrageenanen in Milcherzeugnissen nutzt man nicht nur die Tatsache aus, dass diese Polysaccharid-Derivate bei Präsenz bestimmter Kationen Gele zu bilden vermögen (vgl. Theoretischer Teil, Kapitel 3.3), sondern macht zusätzlich von deren Reaktionsfähigkeit mit den in Milch vorhandenen Proteinen Gebrauch.

Ganz allgemein gesehen hängen die Interaktionsmöglichkeiten von Carrageenanen mit Eiweißstoffen von mehreren Faktoren ab. Dazu gehören insbesondere (Guiseley/Stanley/Whitehouse 1980, S. 5-7):

- der pH-Wert des Systems,
- der isoelektrische Punkt (IEP) des Proteins,
- das Verhältnis der Stoffmengen von Carrageenan und Protein sowie
- die Anwesenheit mehrwertiger Kationen (z. B. Ca^{2+}).

Unter dem isoelektrischen Punkt (IEP) versteht man dabei denjenigen pH-Wert, bei dem sich die negativen und positiven Teilladungen eines in Wasser gelösten Ampholyten kompensieren. Mit diesem Zustand verbunden sind Minima der Löslichkeit sowie der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Entscheidend für den IEP eines Proteins sind die Anzahl saurer und basischer Seitengruppen (z. B. $-\text{COOH}$ bzw. $-\text{NH}_2$) und deren Position im Makromolekül. In Abhängigkeit vom pH-Wert des Systems können diese Gruppen protoniert oder deprotoniert vorliegen und tragen somit unterschiedliche Ladungen (Falbe/Regitz 1995 c, S. 2063 f.).

Im Gegensatz dazu sind bei den Carrageenanen keine pH-bedingten Veränderungen der Nettoladung zu erwarten. Die Sulfat-Gruppen des Algenpolysaccharids liegen unter den in Lebensmitteln vorherrschenden Bedingungen immer in anionischer Form vor, da die Stärke der korrespondierenden Säure $-\text{OSO}_3\text{H}$ mit der ersten Protolysestufe von Schwefelsäure vergleichbar ist (Guiseley/Stanley/Whitehouse 1980, S. 5-6).

Im Folgenden sollen die pH-abhängigen Reaktionsmöglichkeiten von Carrageenanen mit Eiweißstoffen näher betrachtet werden (Guiseley/Stanley/Whitehouse 1980, S. 5-7 f.; Rizotti 1994, S. 196; Snoeren 1980, S. 269 ff.; Trius/Sebranek 1996, S. 77 ff.). Abbildung 79 dient als schematische Zusammenfassung.

In Systemen mit pH-Werten, die niedriger sind als der isoelektrische Punkt des Proteins, kann Carrageenan nicht eingesetzt werden. Unter diesen Bedingungen kommt es durch elektrostatische Anziehung zwischen den protonierten Amino-Seitengruppen des Eiweißes und den anionischen Sulfat-Funktionen des Polysaccharid-Derivats zur Ausfällung eines schwerlöslichen Protein-Carrageenan-Komplexes (vgl. Abbildung 79 a)).

Auch bei $\text{pH} = \text{IEP}$ (Protein) tritt im System eine Reaktion ein, die in Lebensmittelprodukten unerwünscht ist: Aufgrund der Tatsache, dass bei diesen pH-Verhältnissen die positiven Ladungen der protonierten Amino-Seitengruppen durch die der anionischen Carboxylat-Funktionen ausgeglichen werden, verfügt das Eiweiß-Molekül insgesamt über eine Nettoladung von Null. Im isoelektrischen Zustand hat das Protein somit ein Löslichkeitsminimum und flockt aus (vgl. Abbildung 79 b)).

Geeignet sind Carrageenane folglich nur als Zusatzstoffe für Milchprodukte, deren pH-Wert oberhalb des IEP der darin enthaltenen Proteine liegt. Hier sind mehrere unterschiedliche elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den solvatisierten Eiweiß- und Algenpolysaccharid-Teilchen möglich (vgl. Abbildung 79 c)):

Zum ersten sind Abstoßungs-Effekte zwischen gleichsinnig geladenen Carboxylat- und Sulfat-Funktionen denkbar (⊖).

In Systemen, die neben Eiweiß und Carrageenan Salze mit mehrwertigen Kationen (z. B. Ca^{2+}) enthalten, können sich außerdem Calcium-Brücken zwischen gegenüberliegenden anionischen Gruppen des Proteins und des Polysaccharid-Derivats ausbilden (⊕).

Schließlich besteht – insbesondere in Milchprodukten – auch noch die Möglichkeit von spezifischen Interaktionen der Carrageenane mit bestimmten Anteilen der Eiweiß-Fraktion. In Milch verfügt z. B. die Protein-Komponente κ -Casein auch bei pH-Werten oberhalb des isoelektrischen Punktes des Gesamtcaseins noch über eine Anhäufung exponierter Seitengruppen (z. B. Amino-, Imidazol-, und Guanidino-Funktionen), die so starke Basen sind, dass sie auch unter diesen Bedingungen noch in protonierter Form vorliegen und elektrostatische Wechselwirkungen mit den entgegengesetzt geladenen Sulfat-Gruppen des anionischen Polysaccharid-Derivates eingehen können (⊖). Die letztgenannte Carrageenan-Protein-Interaktion soll im Folgenden detaillierter betrachtet werden.

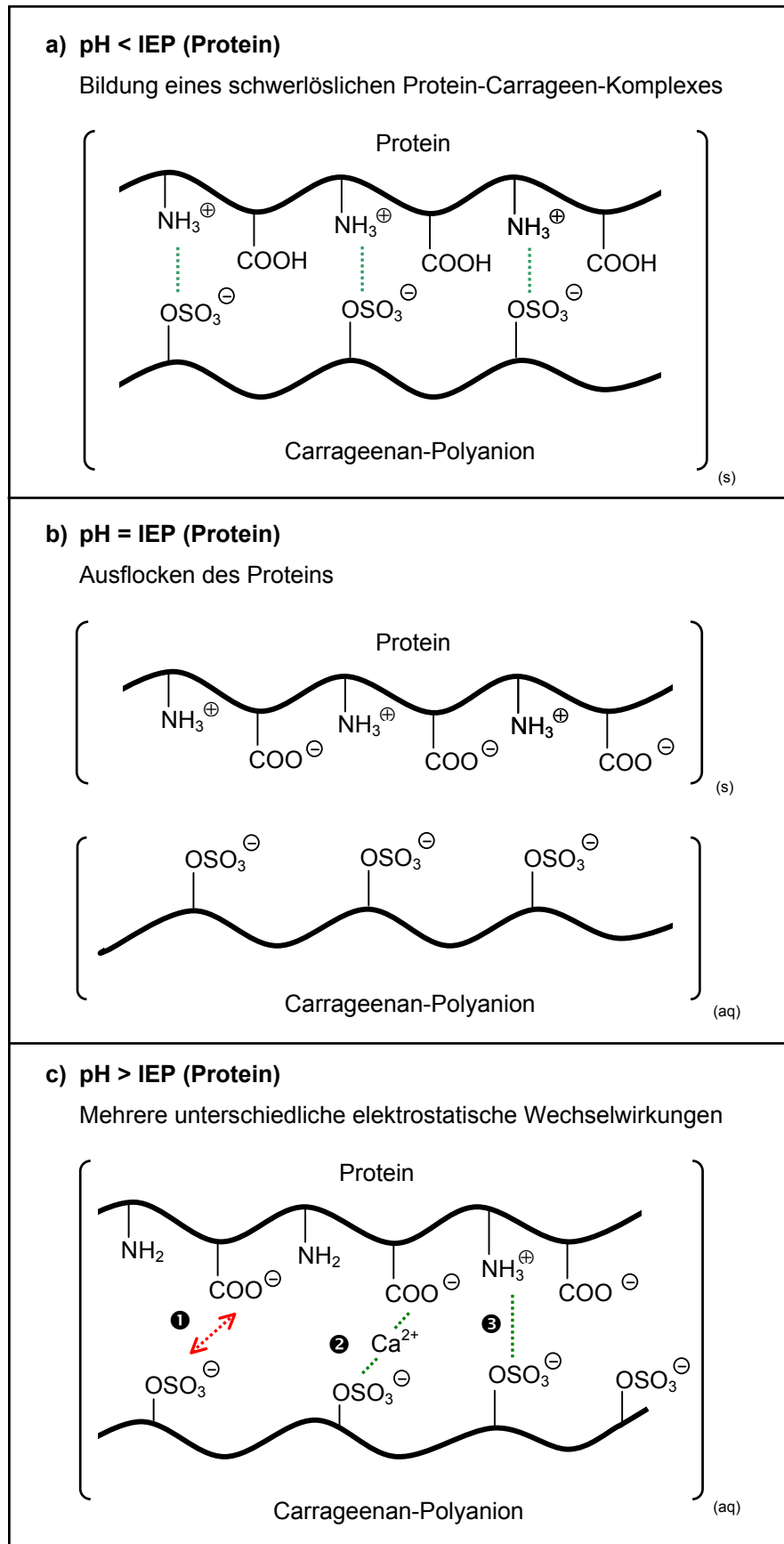


Abb. 79: Interaktionen zwischen Carrageenan und Proteinen bei unterschiedlichen pH-Werten (verändert nach Guiseley/Stalley/Whitehouse 1980, S. 5-7).

In Milchprodukten finden als Zusatzstoffe vor allem die gelbildungsfähigen κ - und ι -Carrageenane Verwendung (Glicksman 1983 b, S. 96). Die Funktion der Algenpolysaccharide in diesen Erzeugnissen wird verständlich aufgrund von Wechselwirkungen mit den in Kuhmilch enthaltenen Inhaltsstoffen und deren charakteristischen Eigenschaften:

Kuhmilch ist eine komplex aufgebaute Flüssigkeit mit einem durchschnittlichen Wasser-Gehalt von 86,6 %. In der wässrigen Phase der Milch, die man auch als Serum bezeichnet, ist das Milchfett in Form kleiner Tröpfchen emulgiert, deren Durchmesser etwa zwischen 0,5 und 0,8 μm liegen. Eine Emulsionsstabilisierung erfolgt dadurch, dass jedes Fett-Tröpfchen von einer Membran umgeben ist, die aus

Phospholipiden und einer Doppelschicht aus Membranproteinen besteht, deren hydrophile Seitenketten zur Wasser-Phase hin orientiert sind. Da die Dichte der Fettröpfchen jedoch geringer ist als die der wässrigen Phase, flotieren diese bei längerem Stehenlassen und setzen sich als Rahmschicht auf der Flüssigkeitsoberfläche ab (Belitz/Grosch 1987, S. 383, 393 f.; Swaisgood 1985, S. 812 f.).

Die in Kuhmilch enthaltenen Proteine, deren Massengehalt sich insgesamt auf etwa 3,6 % beläuft, lassen sich zwei großen Gruppen zuordnen, den sogenannten Caseinen und den Molkenproteinen (Belitz/Grosch 1987, S. 384 ff.):

Mit einem Anteil von 80 % am Gesamtgehalt stellen Caseine die größte Protein-Fraktion der Kuhmilch dar und können aus dieser durch Zugabe von Säuren oder Labferment ausgefällt werden (Falbe/Regitz 1995 a, S. 601). Die Casein-Fraktion enthält drei Haupttypen von Polypeptiden, die mit den Buchstaben α_{S1} , β und κ bezeichnet werden.

Die verschiedenen Casein-Typen liegen in Milch nicht in Form isolierter, kolloidal gelöster Moleküle vor, sondern bilden Aggregate. Dies geschieht dadurch, dass sich die Polypeptid-Ketten der α_{S1} -, β - und κ -Caseine zu räumlichen Strukturen zusammenfallen, deren Form an einen länglichen „Rugbyball“ erinnert.

Wie Abbildung 80 schematisch verdeutlicht, erfolgt eine weitere Zusammenlagerung mehrerer derart geformter Polypeptid-Strukturen zu einer kugelförmigen Einheit, die auch als Submicelle bezeichnet wird (Coultate 1989, S. 101 f.).

Tab. 56: Hauptinhaltsstoffe der Kuhmilch (Swaisgood 1985, S. 796).

Inhaltsstoff	Durchschnittlicher Massenanteil in %
Wasser	86,6
Fett	4,1
Proteine	3,6
Lactose	5,0
Asche	0,7

Im Zentrum jeder Submicelle befinden sich die eher hydrophoben Peptid-Sequenzen der Casein-Moleküle, während Bereiche mit vorwiegend hydrophilen Eigenschaften nach außen orientiert sind: So finden sich z. B. in den zur Kugelhülle gerichteten Teilen der α_{S1} - und β -Caseine jeweils acht bzw. vier polare Phosphoserin-Reste (vgl. Abbildungen 80 und 81). Dahingegen enthält κ -Casein in seinen Peptid-Sequenzen mit hydrophilem Charakter keine phosphatierten Seitenketten (Coultate 1989, S. 101 f.).

Wie aus der umseitig angeführten Abbildung 83 hervorgeht, lagern sich die Submicellen weiter zu größeren kugelförmigen Aggregaten mit Durchmessern zwischen 50 und 300 nm zusammen, die als Casein-Micellen bezeichnet werden. Dabei spielt vor allem die Ausbildung sogenannter Calciumphosphat-Brücken eine entscheidende Rolle: Darunter versteht man elektrostatische Bindungen zwischen den zur hydrophilen Hülle der Submicellen gerichteten Phosphoserin-Resten der α_{S1} - und β -Caseine und den in Milch vorliegenden Calcium- und Hydrogenphosphat-Ionen (Belitz/Grosch 1987, S. 390 f.; Coultate 1989, S. 100 f.). Abbildung 82 zeigt beispielhaft eine Calciumphosphat-Brücke zwischen den Peptidketten von α_{S1} - bzw. β -Casein-Molekülen aus unterschiedlichen Submicellen.

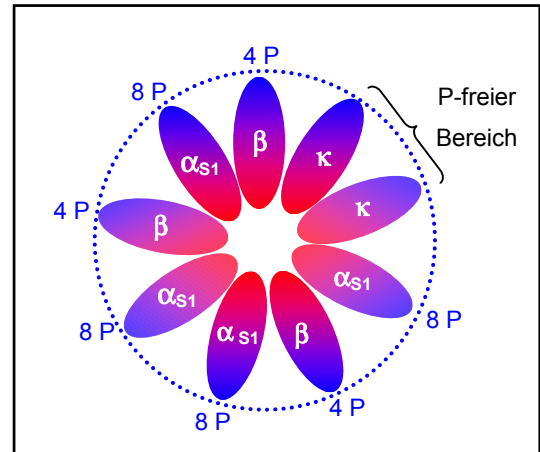


Abb. 80: Schnitt durch eine Submicelle: (Coultate 1989, S. 101; verändert): Hydrophobe Bereiche der zu „rugbyballartigen“ Strukturen zusammengefalteten α_{S1} -, β - und κ -Casein-Ketten sind rot, hydrophile Anteile blau gekennzeichnet; P steht für die Phosphat-Gruppen der Phosphoserin-Reste (vgl. Abb. 81).

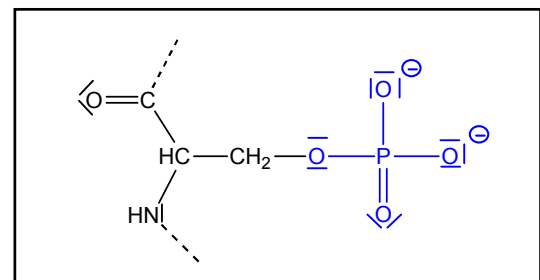


Abb. 81: Phosphoserin-Rest.

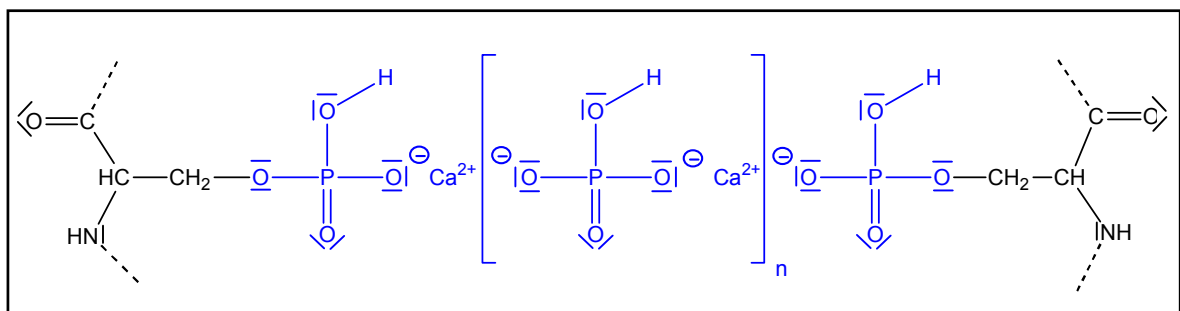


Abb. 82: Calciumphosphat-Brücke zwischen den Phosphoserin-Resten der α_{S1} - bzw. β -Caseine und den in Milch vorhandenen Calcium- und Hydrogenphosphat-Ionen (Belitz/Grosch 1987, S. 391; verändert).

Aufgrund der Tatsache, dass die Polypeptid-Ketten des κ -Caseins nicht über Phosphoserin-Reste verfügen, können diese keine Calcium-Ionen binden und sind somit nicht an der Verbrückung der Submicellen beteiligt (Coulatae 1989, S. 102 f.).

In der Abbildung 83 wird der Aufbau einer Casein-Micelle zusammenfassend in modellhafter Form wiedergegeben:

Die hydrophoben Zentren der Submicellen sind rot, die hydrophilen Hüllen blau dargestellt. Blaue Linien symbolisieren die Calciumphosphat-Brücken, über die sich die Untereinheiten assoziieren.

Wie ebenfalls ersichtlich ist, stellen die hydrophilen Domänen der κ -Caseine nichtbindende Regionen dar. Die κ -Casein-Bestandteile der Submicellen sind daher bevorzugt in Richtung der Oberfläche der Gesamtmicelle orientiert (Coulatae 1989, S. 103).

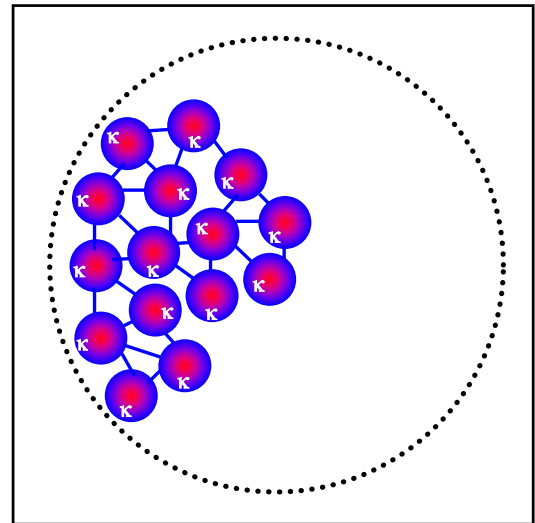


Abb. 83: Schematisches Modell einer Casein-Micelle (Belitz/Grosch 1987, S. 391; Coulatae 1989, S. 101; verändert).

Neben den Caseinen enthält Milch noch eine zweite große Gruppe von Eiweiß-Stoffen, die so genannten Molkenproteine. Unter Molke versteht man die Flüssigkeit, welche aus Milch nach Entfernung des Fettes und Abtrennung des ausgefällten Caseins erhalten wird (Falbe/Regitz 1995 d, S. 2830 f.). Die in Molke kolloidal gelösten Eiweiß-Stoffe sind in erster Linie α -Lactalbumin sowie β -Lactoglobulin und haben einen Anteil von 20 % am Gesamtprotein-Gehalt der Milch (Belitz/Grosch 1987, S. 391 f.; Coulatae 1989, S. 100).

In Form einer echten Lösung liegen in der wässrigen Phase von Milch lediglich die Kohlenhydrat-Bestandteile sowie die nicht in den Casein-Micellen gebundenen Mineralsalze vor. Die wichtigste Zucker-Komponente der Milch ist die Lactose, deren Massenanteil durchschnittlich 5,0 % beträgt (vgl. Tabelle 56, S. 238).

Bei den in Milch gelösten Salzen handelt es sich vor allem um die Chloride, Phosphate, Citrate und Hydrogencarbonate von Na^+ , K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} . In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass der in Tabelle 54 angegebene Asche-Anteil der Milch von 0,7 % nicht exakt dem Gesamtgehalt an Mineralsalzen entspricht, sondern vielmehr die Masse derjenigen Metallsalze angibt, die bei der Milchverbrennung als Produkte anfallen (Swaisgood 1985, S. 799).

Wird nun κ -Carrageenan als Geliermittel in Produkten auf Milchbasis eingesetzt, so interagiert das Algenpolysaccharid nach Auflösung in der Milch spezifisch mit κ -Casein (Stanley 1990, S. 97 ff.). Die damit verknüpften Vorgänge sollen im Folgenden näher erläutert werden:

Wie in dem Exkurs über die Zusammensetzung von Milch deutlich wurde, sind in den Casein-Micellen die hydrophilen κ -Casein-Bestandteile der Untereinheiten als nichtbindende Domänen bevorzugt in Richtung der Micellen-Oberfläche orientiert. Die derart exponierten polaren Peptid-Sequenzen des κ -Caseins enthalten zwischen den Aminosäure-Bausteinen 97 und 112 eine etwa 1 – 1,2 nm lange Region, in der sich eine Anhäufung von Arginin-, Histidin- und Lysin-Resten befindet (Snoeren et al. 1975, S. 395; Snoeren 1976, S. 71). Der in Abbildung 84 abgedruckte Ausschnitt aus der Primärstruktur des κ -Caseins dient der Verdeutlichung dieses Umstandes. Zur Bezeichnung der Aminosäuren wurden die von der IUPAC-Nomenklaturkommission empfohlenen Dreibuchstabensymbole verwendet (Falbe/Regitz 1995 a, S. 160 f.):

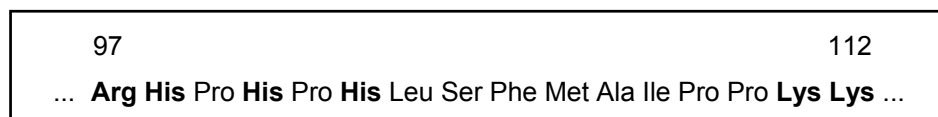


Abb. 84: Aminosäure-Sequenz des κ -Caseins im Bereich der Bausteine 97 bis 112 (Swaisgood 1985, S. 807).

Die Seitenketten von Arginin, Histidin und Lysin enthalten Guanidino-, Imidazol- bzw. zusätzliche Amino-Gruppen, die aufgrund ihrer relativ hohen Basizität bei dem in Milch vorherrschenden pH-Wert von 6,4 – 6,7 in beträchtlichem Ausmaße in protonierter Form vorliegen und somit positiv geladen sind (Falbe/Regitz 1995 d, S. 2789; Snoeren et al. 1975, S. 395; Snoeren 1976, S. 71). Die entsprechenden Formeln und pK_s -Werte entnehme man Abbildung 85.

Im Gegensatz zu den Substituenten der Arginin-, Histidin- und Lysinreste sind die Sulfatgruppen der κ - und ι -Carrageenane unter den pH-Bedingungen in Milchprodukten generell deprotoniert, d. h. sie weisen negative Ladungen auf.

Auf der Basis von Elektrophorese-, Lichtstreuungs- und Sedimentationsstudien sowie Untersuchungen zur Farbstoffbindung konnte nachgewiesen werden, dass unter Erwärmen in der wässrigen Phase von Milch gelöste κ - bzw. ι -Carrageenan-Polyanionen elektrostatisch an die 1 – 1,2 nm lange positiv geladene Peptid-Sequenz des κ -Caseins in den Casein-Micellen gebunden werden (Grindrod/Nickerson 1968; Payens 1972; Snoeren 1976; Snoeren et al. 1975; zitiert in Stanley 1990, S. 98).

Peptidkette	Aminosäure	—R	pK _s
	Arg		13,2
	His		6,1
	Lys		10,8

Abb. 85: Die Aminosäure-Bausteine Arginin, Histidin und Lysin: Formeln der Seitenketten und pK_s-Werte der protonierten Guanidino-, Imidazol- bzw. Amino-Gruppen (Vollhardt 1990, S. 1266 f.).

Bei Abkühlung der Milch auf Temperaturen unterhalb der Gelierpunkte der Algenpolysaccharide lagern sich dann freie, d. h. nicht an Casein-Micellen gebundene Teilabschnitte der κ - bzw. ι -Carrageenan-Ketten zu Doppelhelices zusammen. Diese Helices können sich durch Einlagerung der in Milch vorhandenen hydratisierten Kationen (z. B. Ca²⁺ und K⁺) weiter unter Ausbildung so genannter „aggregated domains“ assoziieren. Auf diese Weise entsteht – wie im Falle proteinfreier wässriger Systeme – ein dreidimensionales Gelgerüst (Snoeren 1976, S. 72).

Die mit der Milchreaktivität von κ - und ι -Carrageenan im Zusammenhang stehenden Vorgänge werden in Abbildung 86 schematisch wiedergegeben.

Die Einbindung der Casein-Micellen in das dreidimensionale Polysaccharid-Gerüst bewirkt eine enorme Erhöhung der Gelstärke: Um ein Gel auf Milchbasis zuzubereiten, benötigt man daher nur etwa 1/5 der Carrageenan-Menge, die für die Herstellung eines Wassergels mit vergleichbarer Festigkeit erforderlich wäre (Firma Copenhagen Pectin 1996 a, S. 13).

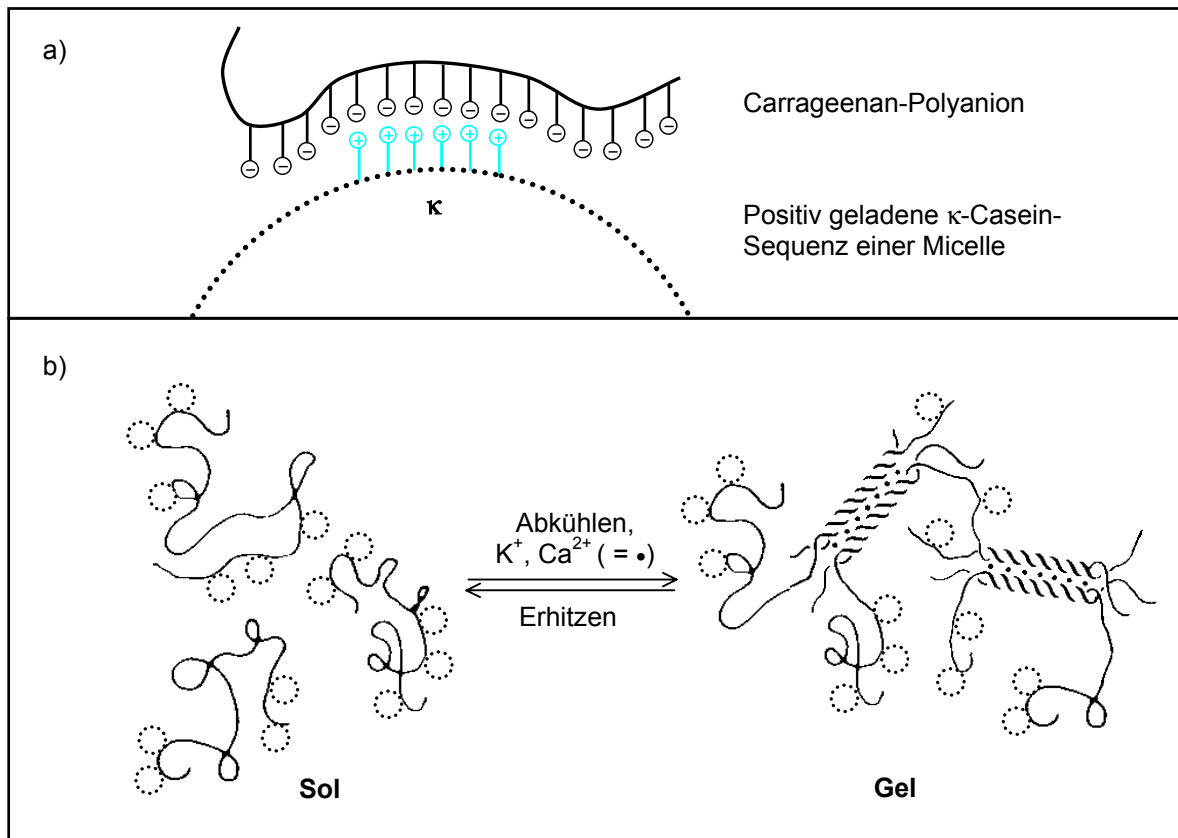


Abb. 86: Milchreaktivität von Carrageenänen (Schematische Darstellung):

- a) Bindung des Carrageenans an die Casein-Micelle durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den anionischen Sulfat-Gruppen des Algenpolysaccharids (schwarz) und positiv geladenen Substituenten in den Seitenketten der Peptid-Sequenz von κ -Casein (türkis) (Stanley 1990, S. 98; verändert).
- b) Gelbildung in carrageenanhaltigen Milchsystemen (Clark/Ross-Murphy 1986, S. 120; Snoeren 1976, S. 73; verändert); Casein-Micellen werden durch gepunktete Kreise symbolisiert.

In der Lebensmittelindustrie nutzt man die Milchreaktivität von κ - und ι -Carrageenänen für die Herstellung verschiedener gelartiger Süßspeisen auf Milchbasis aus, zu denen beispielsweise Instant-Desserts, kalorienreduzierte Puddings und Dessertsaucen zählen.

Der Gehalt an Algenpolysaccharid beträgt bei diesen Anwendungen nur etwa 0,2 – 0,3 % der Masse des Fertigerzeugnisses (Stanley 1990, S. 105) und liegt somit deutlich niedriger als im Falle von Dessertgelen auf Wasserbasis (vgl. S. 225 dieser Arbeit).

Abbildung 86 zeigt ausgewählte Beispiele für auf dem deutschen Markt befindliche Produkte.



Abb. 86: Beispiele für handelsübliche Lebensmittelzeugnisse auf Milchbasis, in denen Carrageenan als Geliermittel eingesetzt wird.

Eine kommerziell bedeutende Rolle spielt auch die Verwendung von κ -Carrageenan in Milcherzeugnissen, deren gelartige Beschaffenheit auf den ersten Blick gar nicht erkennbar ist:

So wird das Algenpolysaccharid häufig als Stabilisator in pasteurisierten und sterilisierten Kakaotränken eingesetzt (Rizotti 1995, S. 204 f.; Stanley 1990, S. 105; Thomas 1997, S. 58). Beispiele für im Lebensmittelhandel erhältliche Fertigprodukte dieser Art sind Abbildung 87 zu entnehmen.

Wie aus Tabelle 57 ersichtlich ist, verfügen solche Kakaotränke typischerweise über einen Saccharose-Gehalt von $w = 6\%$ und einen Kakao-Anteil, der sich auf etwa ein Massenprozent beläuft.

κ -Carrageenan wird diesen Milcherzeugnissen nur in sehr geringen Mengen zugesetzt und erfüllt folgende Funktionen: Schon bei Vorliegen mit einem Massengehalt von $0,02 - 0,05\%$ vermag dieses Polysaccharid-Derivat – wie auf S. 240 ff. beschrieben – unter elektrostatischer Interaktion mit den in Milch enthaltenen Casein-Micellen dreidimensionale Gelnetzwerke zu bilden. Die resultierenden Gele sind so schwach, dass das Kakaotränke seine augenscheinlich flüssige Konsistenz behält, aber gleichzeitig

stabil genug ist, um die in Milch aufgrund ihres hohen Fett-Gehaltes unlöslichen Kakao-Partikel einzulagern und so deren Sedimentation zu verhindern.

Besonders im Falle von Milchprodukten mit langer Haltbarkeit ist eine derartige Stabilisierung relevant, da von den Verbrauchern ein starkes Absetzen des Kakaos oft als qualitätsminderndes Merkmal angesehen wird (Rizotti 1995, S. 204).

In Kakaotränken mit niedrigem Fettgehalt erfüllt das zugesetzte κ -Carrageenan noch eine zweite Funktion: Durch die Bildung des schwachen Algenpolysaccharid-Casein-Gels werden die sensorischen Eigenschaften dieser Erzeugnisse entscheidend verbessert. Sie erhalten eine cremigere Beschaffenheit und kommen damit geschmacklich Vollmilchprodukten nahe (Glicksman 1983 b, S. 98).



Abb. 87: Mit κ -Carrageenan stabilisierte Kakaotränke: Produktbeispiele.

Tab. 57: Typische Zusammensetzung von Kakaotränken mit κ -Carrageenan als Stabilisator (Glicksman 1983 b, S. 98; Thomas 1997, S. 58; verändert).

Komponente	Massenanteil in %
Saccharose	6
Kakao	1
κ -Carrageenan	0,02 – 0,05
Milch	Rest

Experimentelle Veranschaulichung

In der Arbeit wurden drei Versuche konzipiert, mit denen sich die Anwendungsmöglichkeiten von Carrageenanen in Milchprodukten verdeutlichen lassen.

(1) pH-Abhängigkeit der Reaktion des Rotalgenpolysaccharids mit Proteinen

In Experiment 46 soll zunächst die pH-abhängige Reaktion der anionischen Polysaccharid-Derivate mit Eiweißstoffen näher untersucht werden. Als Modellsystem für Proteine dient dabei eine gesättigte, vom unlöslichen Rückstand abfiltrierte Caseinat-Lösung, die durch Suspension von Casein in verdünnter Natronlauge ($c = 0,01 \text{ mol/L}$) hergestellt wird (Falbe/Regitz 1995 a, S. 601).

In zwei Bechergläsern versetzt man je 20 mL der Caseinat-Lösung ($\text{pH} = 6 - 7$) mit gleichen Volumina

- entionisierten Wassers bzw.
- κ -Carrageenan-Sol ($\rho^* = 1 \text{ g/L}$).

Die resultierenden Mischungen sind praktisch klar (vgl. Abbildung 88 a)). Wie zuvor diskutiert, liegen unter diesen Bedingungen die solvatisierten Protein-Moleküle mit negativ geladenen Carboxylat-Seitengruppen und Carrageen-Polyanionen vor (vgl. S. 235 ff.).

Unter Rühren mittels Magnetrührer werden nun die beiden Proben nacheinander in 0,5-mL-Schritten mit Salzsäure ($c = 0,05 \text{ mol/L}$) aus einer Bürette versetzt. Dabei verfolgt man die Änderung der Protonen-Konzentration mit Hilfe eines pH-Meters.

In dem Bereich um den isoelektrischen Punkt des Caseins (vgl. Abbildung 88 b)), der etwa bei $\text{pH} = 4,6$ liegt (Falbe/Regitz 1995 a, S. 601), erreicht das Protein aufgrund der Kompensation der Ladungen kationischer und anionischer Seitengruppen ein Löslichkeitsminimum und flockt aus (s. auch S. 235 ff.).

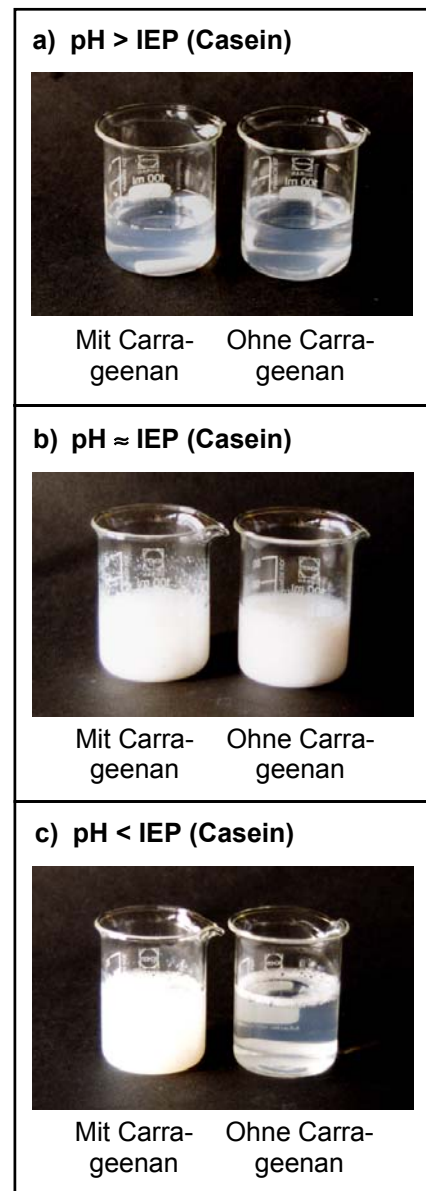


Abb. 88: pH-abhängige Reaktion von κ -Carrageenan mit Casein (vgl. Experiment 46).

Sobald der IEP des Caseins deutlich unterschritten wird (in Experiment 46 um $\text{pH} = 2,4$), klärt die Probe ohne κ -Carrageenan-Zusatz wieder auf (vgl. Abbildung 88 c)). Hier liegen nun Protein-Moleküle vor, die durch die Präsenz protonierter Amino-Gruppen über eine positive Nettoladung verfügen und somit gut wasserlöslich sind. In der algenpolysaccharidhaltigen Probe hingegen bildet sich ein schwerlöslicher Casein-Carrageenan-Komplex, der durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Seitengruppen des Proteins und den Sulfat-Gruppen des Polysaccharid-Derivates verursacht wird. Zum theoretischen Hintergrund siehe auch S. 235 ff.

Der Versuch zeigt also, dass sich Carrageenane lediglich in Systemen einsetzen lassen, deren pH-Werte niedriger sind als der isoelektrische Punkt des jeweils vorliegenden Proteins.

(2) Stabilität von κ -Carrageenan-Gelen auf Milch- und Wasserbasis

Im zweiten Versuch zur Verwendung von Carrageenan in Milchprodukten (Experiment 47) soll ein Vergleich der Stärken von κ -Carrageenan-Gelen auf Wasser- und Milchbasis vorgenommen werden. Detaillierte Angaben zur Arbeitsweise sind dem Experimentellen Teil, Kapitel 2.2.4.1 zu entnehmen). Dargelegt sei hier lediglich das Versuchsprinzip:

Zunächst werden zwei κ -Carrageenan-Sole mit Massengehalten von $w \approx 0,3 \%$ hergestellt. Dazu löst man unter Erwärmen und intensivem Rühren jeweils 0,150 g κ -Carrageenan in 50 mL

- einer Salzlösung, deren Ca^{2+} -, Mg^{2+} -, Na^+ - und K^+ -Konzentrationen denen in der wässrigen Phase von Vollmilch entsprechen,
- Vollmilch.

Nach fünfzehnminütigem Abkühlen der beiden Carrageenan-Sole in einer Kältemischung aus Eis und Kochsalz erhält man die in Abbildung 89 wiedergegebenen Reaktionsprodukte. Wie das Foto veranschaulicht, ist das mit der Salzlösung hergestellte κ -Carrageenan-Wassergel sehr labil; es zerfällt bereits bei mechanischer Belastung durch Schütteln der Petrischale. Im Gegensatz dazu zeichnet sich das Gel auf Milchbasis durch eine hohe Stabilität aus, die sich in der Schnittfestigkeit des Produktes manifestiert. Da für die Zubereitung des κ -Carrageenan-Wassergels eine Salzlösung verwandt wurde, deren Calcium-, Magnesium-, Natrium- und

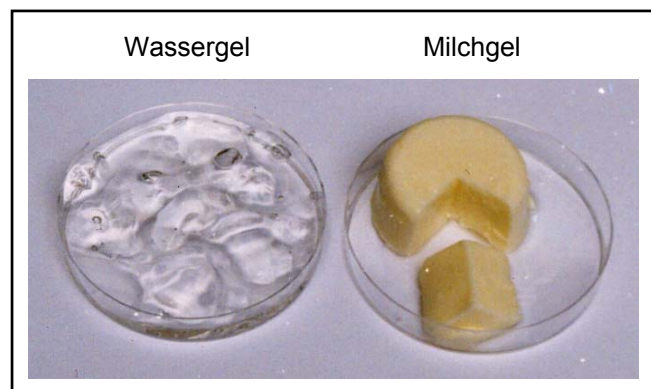


Abb. 89: Vergleich der Gelstärken von κ -Carrageenan-Gelen auf Wasser- und Milchbasis (Experiment 47).

Kalium-Konzentrationen genauso groß sind wie diejenigen in der wässrigen Phase von Vollmilch (Swaisgood 1985, S. 801), lässt sich folgern, dass die in Experiment 47 demonstrierte höhere Festigkeit des κ -Carrageen-Milchgels nicht durch die in Milch enthaltenen gelinduzierenden Kationen, sondern durch andere Bestandteile verursacht werden muss. Das Versuchsergebnis steht also im Einklang mit den im Vorangehenden diskutierten Befunden aus wissenschaftlichen Studien, in welchen die enorme Stabilität von Carrageenan-Milchgelen durch die Bildung eines elektrostatischen Komplexes zwischen den Casein-Micellen und dem Algenpolysaccharid erklärt wird.

(3) κ -Carrageenan als Kakaostabilisator

Experiment 48 hat das Ziel, die Einsatzmöglichkeit von κ -Carrageenan als Stabilisator für Kakaogetränke zu veranschaulichen. Bei der Entwicklung des Versuchs erfolgte eine Orientierung an den von Glicksman (1983 b, S. 98) und Rizotti (1995, S. 204 f.) beschriebenen industriellen Herstellungsverfahren für haltbare Produkte: Zunächst vermischt man die für die Stabilisierung des Kakaos notwendige Menge an κ -Carrageenan gründlich mit den anderen festen Inhaltsstoffen der Schokoladenmilch, d. h. also Saccharose und Kakaopulver. Im Versuch geschieht dies unter Zuhilfenahme eines Mörsers. Das Gemisch der Trockenbestandteile wird daraufhin unter Rühren in kalter, fettarmer H-Milch suspendiert. Um eine vollständige Auflösung des κ -Carrageenans sicherzustellen, wird die resultierende Suspension auf $\vartheta = 70\text{ °C}$ erhitzt und dann noch weitere fünf Minuten auf dieser Temperatur gehalten. Dabei ist durch Rühren für eine gute Durchmischung zu sorgen.

Das erhaltene Kakaogetränk wird abschließend in einer Kältemischung aus Eis und Kochsalz auf Raumtemperatur abgekühlt. Während der dafür erforderlichen Zeit muss durch intensives Rühren für eine gute Durchmischung gesorgt werden, da die Kakao-Partikel schneller absinken, als sich das Polysaccharid-Casein-Gelgerüst bildet: „Sedimentation of cocoa will occur prior to the network formation [...] unless the chocolate milk is subjected to agitation [...]“ (Rizotti 1985, S. 205).

In Experiment 48 wird als Vergleichsprobe ein auf analoge Weise zubereitetes, aber kein κ -Carrageenan enthaltendes Kakaogetränk eingesetzt. Wie aus Abbildung 90 ersichtlich ist, kann man in dem Ansatz ohne Stabilisator schon nach kurzer Zeit das Absinken von Kakao-Partikeln beobachten. Im Falle des mit κ -Carrageenan stabilisierten Milchproduktes tritt dieser Effekt hingegen nicht ein.

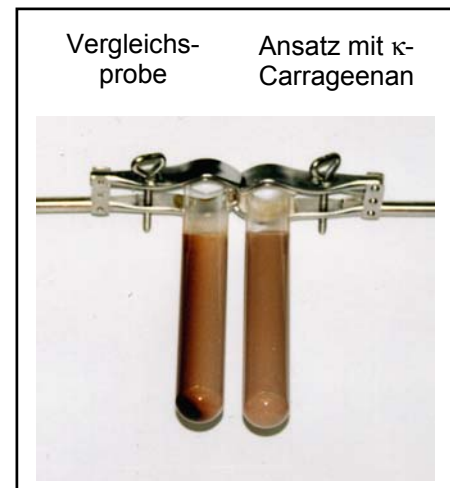


Abb. 90: Stabilisierung von Kakaogetränken mit κ -Carrageenan (Experiment 48).

3.5.3 Potentielle neue Einsatzzwecke

3.5.3.1 Versuche zur Racemat-Spaltung mit Carrageenanen

Theoretischer Hintergrund

Wie bei Alginaten handelt es sich auch bei Carrageenanen um anionische Polysaccharid-Derivate, die über Chiralität verfügen. In der vorliegenden Arbeit soll daher untersucht werden, ob die Rotalgenpolysaccharide für die Enantiomeren-Trennung eingesetzt werden können. Die Vorgänge, die der Racemat-Spaltung an optisch aktiven Adsorbentien und Ionenaustauschern zugrunde liegen, wurden bereits in Teil B, Kapitel 2.6.5.2 diskutiert.

Herstellung von Säulenfüllungen aus κ - und ι -Carrageenanen

Als chromatographisches Trägermaterial sind nur die gelbildenden κ - und ι -Carrageenane geeignet. Die Herstellung von Gelkugeln aus diesen beiden Rotalgenpolysacchariden ist aber deutlich schwieriger als im Falle von Alginaten, weil Carrageenan-Gele Thermoreversibilität aufweisen. In Versuchsreihen haben sich jedoch die in Tabelle 58 zusammengestellten Vorgehensweisen als praktikabel herausgestellt:

Tab. 58: Möglichkeiten der Herstellung von κ - und ι -Carrageenan-Gelkugeln.

Polysaccharid-Variante	Carrageenan-Lösung		Gelierbad ^a	Prinzip der Gelkugel-Produktion
	$\rho^*/\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	$\vartheta/^\circ\text{C}$		
κ -Carrageenan (nicht standardisiert, „SPF 042“, Firma Eurogum)	20	80	KCl-Lösung (w = 0,1)	<u>Große Kugeln:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Wund- und Blasenspritze (100 mL) mit Adapter; • 25-mL-Portionen des heißen Sols tropfen ohne äußere Einwirkung ein; • zu schnell abkühlendes Sol geliert bereits in der Spritze. <hr/> <u>Kleine Kugeln:</u> <ul style="list-style-type: none"> • 20-mL-Spritze mit Kanüle (d = 0,45 mm, l = 12 mm); • 10-mL-Portionen des heißen Sols werden manuell mit Stempel durch Kanüle gedrückt; • Wechsel der Kanüle nach jeder Probe erforderlich;
ι -Carrageenan (nicht standardisiert, „S 1495“, Firma Eurogum)	20	80	Calciumchlorid-Lösung (c = 1,5 mol/L)	<u>Große Kugeln:</u> vgl. κ -Carrageenan <hr/> <u>Kleine Kugeln:</u> vgl. κ -Carrageenan

^a Durchmischung mittels Magnetrührer und Rührfisch.

Wie bereits durch die Angaben in Tabelle 58 deutlich wird, ist die Herstellung von Carrageenan-Gelkugeln mit sehr hohem Aufwand verbunden:

- Ein Gelieren der Algenpolysaccharid-Lösung in der Spritze oder der Kanüle lässt sich nur durch Verwendung sehr kleiner, etwa 80 °C warmer Sol-Portionen verhindern. Dies hängt damit zusammen, dass in Carrageenan-Solen beim Abkühlen unter diese Temperatur bereits Gelbildungsprozesse einsetzen.
- Durch Carrageenan-Gele verstopfte Spritzen können zwar mechanisch oder durch Spülen mit heißem Wasser gereinigt werden, aber bei Kanülen ist dies nicht möglich. Letztere sind daher jeweils nach Gebrauch zu verwerfen.

Gemäß den in Kapitel 3.5.2.2 beschriebenen Eigenschaften von Carrageenan-Gelen, sind die hergestellten Kugeln der κ -Variante sehr fest und spröde, während die ι -Carrageenan-Produkte weniger Gelfestigkeit, aber eine höhere Elastizität aufweisen.

Stabilität von κ - und ι -Carrageenan-Kugeln gegenüber verschiedenen Elutionsmitteln

Bevor untersucht werden kann, ob sich die hergestellten κ - und ι -Carrageenan-Kugeln für die Enantiomeren-Trennung im Säulenbetrieb oder Batch-Verfahren eignen, ist zunächst deren Verhalten in wässrigen Medien und organischen Solventien zu überprüfen. Die Ergebnisse der dazu durchgeführten Experimente finden sich in den Tabellen 59 und 60.

(1) Wässriges Milieu

Tab. 59: Stabilität von Carrageenanen gegenüber wässrigen Elutionsmitteln.

Gelkugeln	Verwendete Elutionsmittel			
	Entionisiertes Wasser	Wässrige Lösung mit gelbildenden Kationen	Verdünnte Salzsäure	Salzsäure mit gelbildenden Kationen
κ -Carrageenan	Auflösung	Stabilität bei	Auflösung	Stabilität bei
		ρ^* (KCl) = 10 g/L		c (HCl) = 0,01 mol/L, ρ^* (KCl) = 10 g/L
ι -Carrageenan	Auflösung	Stabilität bei	Auflösung	Stabilität bei
		ρ^* (CaCl ₂) = 10 g/L		c (HCl) = 0,01 mol/L, ρ^* (CaCl ₂) = 10 g/L

Wie aus den Angaben in Tabelle 59 ersichtlich ist, sind κ - und ι -Carrageenan-Kugeln nur dann in wässrigen Lösungen stabil, wenn diese über einen gewissen Gehalt an gelbildenden Kationen verfügen. Als günstig haben sich Massenkonzentrationen von ρ^* (KCl) bzw. ρ^* (CaCl₂) = 10 g/L erwiesen.

Im Gegensatz zu Alginaten bilden Carrageenane bei Behandlung mit verdünnter Salzsäure keine Gele. Dies liegt daran, dass die Sulfat-Gruppen der Rotalgenpolysaccharide eine deutlich geringere Basenstärke aufweisen als die Carboxylat-Funktionen der Alginate und somit praktisch nicht protonierbar sind. Um eine Auflösung in sauren Medien zu verhin-

dern, müssen daher auch hier die in Tabelle 57 aufgeführten Konzentrationen an K^+ - und Ca^{2+} -Kationen aufrechterhalten werden.

(2) Organische Solventien

Die Effekte der Behandlung von κ - und ι -Carrageenan-Gelen mit organischen Elutionsmitteln werden am Beispiel von Ethanol getestet. Ähnlich wie bei Alginsäure und Calciumalginaten löst sich hier ein Teil des in das Gelgerüst eingebundenen Wassers in dem Alkohol. Durch diesen Dehydratisierungsvorgang verringert sich das Volumen der Carrageenan-Kugeln. Außerdem werden aus den Gelen Luftblasen freigesetzt, die die Benetzung des Trägermaterials mit dem Lösungsmittel stören (vgl. Tabelle 60).

Tab. 60: Stabilität von κ - und ι -Carrageenan-Kugeln gegenüber Ethanol.

Gelkugeln	Spülen der Säule mit Ethanol	Spülen der Säule mit Ethanol nach Vorbehandlung ^a
κ -Carrageenan		
<u>Geliert mit:</u>		
KCl-Lösung (w = 0,1)	Schrumpfung, Luftblasen	Weiße Kugeln (Ausfällung von KCl)
NH ₄ Cl-Lösung (w = 0,1)	Nicht getestet	Transparente, stabile Kugeln
ι -Carrageenan	Schrumpfung, Luftblasen	Gel zu labil

^a Beschreibung der Methode: s. u.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur Vorbehandlung von Alginsäure- und Calciumalginat-Gelkugeln mit Ethanol (vgl. Teil B, Kapitel 2.6.5.2) lässt sich aber nicht ohne Weiteres auf mit Kalium-Ionen geliertes κ -Carrageenan übertragen: Bei den wiederholten Spülvorgängen mit dem Alkohol scheidet sich im Inneren der Carrageenan-Kugeln festes Kaliumchlorid ab, da dieses Salz in Ethanol nur sehr schlecht löslich ist (0,034 g KCl pro 100 g Solvens).

Dieses Problem kann dadurch umgangen werden, dass man zum Gellieren alternativ eine Ammoniumchlorid-Lösung gleicher Massenkonzentration einsetzt. Aufgrund der deutlich besseren Ethanol-Löslichkeit von NH₄Cl (0,6 g pro 100 g Alkohol), entsteht hier bei Lösungsmittelaustausch im Inneren der Gelkugeln kein Niederschlag mehr.

Methodisch hat es sich bewährt, jeweils 50 g mit NH₄⁺-Ionen gebildete κ -Carrageenan-Kugeln sechsmal sukzessive mit 75 mL Ethanol zu behandeln. Die dabei resultierenden Algenpolysaccharid-Partikel sind transparent und weisen genügend Stabilität für den Säulenbetrieb mit Ethanol als Elutionsmittel auf.

Versuche zur Enantiomeren-Trennung mit κ -Carrageenanen

Unter Berücksichtigung der in Vortests gewonnenen Erkenntnisse über die Herstellung und Handhabung von κ -Carrageenan-Kugeln wurden dann verschiedene Versuche zu deren Verwendbarkeit für die Racemat-Spaltung durchgeführt. In Tabelle 61 sind die Ergebnisse im Überblick dargestellt.

Tab. 61: Versuche zur Racemat-Spaltung mit κ -Carrageenan in verschiedenen Einsatzformen.

Chiraler Träger	Methode	Racemat	Trennerfolg ^b
NH ₄ ⁺ -Gelkugeln (vorbehandelt mit Ethanol ^a)	Säulenbetrieb	(±)-1-Phenylethanol (Reinsubstanz)	negativ
	Elution mit Ethanol	Nachweisbarkeit im Eluat ^c : +	
NH ₄ ⁺ -Gelkugeln (vorbehandelt mit Ethanol ^a)	Batch-Verfahren	(±)-Phenylethylamin (ethanolische Lösung)	negativ
NH ₄ ⁺ -Gelkugeln (vorbehandelt mit Ethanol ^a)	Batch-Verfahren	(±)-1-Phenylethanol (Reinsubstanz)	negativ
κ -Carrageenan (Feststoff) („SPF 042“, Firma Eurogum)	Batch-Verfahren	(±)-1-Phenylethylamin (Reinsubstanz)	negativ

^a Zur Beschreibung der Vorbehandlungsmethode vgl. S. 250.

^b Polarimetrische Messung (s. u.).

^c Fluoreszenz-Löschung im UV-Licht ($\lambda = 275$ nm) bei Auftragen der Proben auf DC-Karten mit Fluoreszenz-Indikator.

Die Überprüfung des Trennerfolges erfolgt jeweils durch polarimetrische Untersuchung der Eluat-Fractionen (Säule) bzw. der nach bestimmten Zeiten aus dem Gesamtgemisch entnommenen Proben (Batch).

Um sicherzustellen, dass bei dem Versuch im Säulenbetrieb nicht das gesamte Racemat an den κ -Carrageenan-Gelkugeln gebunden wird, trägt man Proben der Eluat-Fractionen auf eine DC-Karte mit Fluoreszenz-Indikator auf. Bei Untersuchung im UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) beobachtet man in Gegenwart von (±)-1-Phenylethanol Fluoreszenz-Löschung.

Fazit

In keinem der Versuchsansätze mit unterschiedlichen Enantiomeren-Gemischen lassen sich Anzeichen auf Auftrennung feststellen. Da zudem die Herstellung von Trägermaterialien aus κ -Carrageenan-Kugeln extrem aufwändig ist und diese nur unter sehr eingeschränkten Bedingungen stabil bleiben, werden die Experimente zur Racemat-Spaltung mit diesen Materialien nicht fortgeführt.

4 Chemiedidaktische Relevanz der vorgestellten Inhalte

4.1 Algenpolysaccharide im Chemieunterricht

4.1.1 Alginat

Erwartungsgemäß ist die Behandlung des Themas „Alginat“ lehrplangemäß in keinem der deutschen Bundesländer vorgesehen (Bader/Steiner 1994, S. 38 ff., 46 ff., 66 ff., 78 ff., 90 ff., 110 ff., 126 ff., 142 ff., 152 ff., 162 ff., 178 ff., 192 ff., 208 ff., 226 ff., 236 ff., 252 ff.). Im Folgenden soll aber exemplarisch gezeigt werden, dass sich die im Rahmen dieser Arbeit diskutierten theoretischen Aspekte sowie die zu deren Veranschaulichung entwickelten Experimente durchaus Inhaltsbereichen zuordnen lassen, mit denen üblicherweise eine Auseinandersetzung im Unterrichtsfach Chemie erfolgt (vgl. auch Abbildung 91).

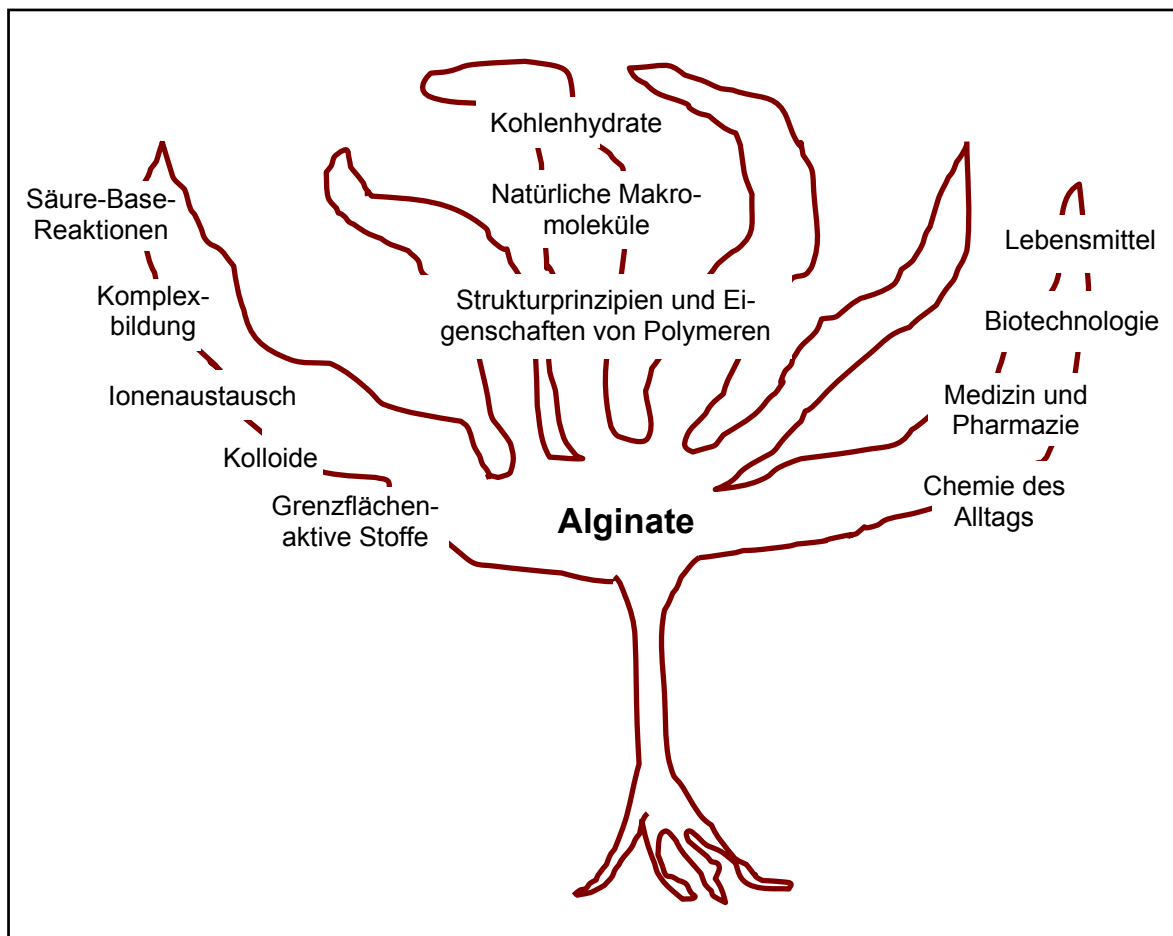


Abb. 91: Behandlung des Themas „Alginat“ im Chemieunterricht.

Vertiefung, Erweiterung und Anwendung der Kohlenhydratchemie

Eine Beschäftigung mit Alginaten wäre beispielsweise im Rahmen des Themas „Kohlenhydrate“ denkbar, das häufig obligatorischer Gegenstand des Unterrichts in der gymnasialen Oberstufe ist oder zumindest eine Option im Katalog der Wahlpflichtthemen darstellt, und zwar in der Regel sowohl im Grund- als auch im Leistungskursbereich (Bader/Steiner 1994, S. 40, 42, 54, 62, 76, 84, 100, 104, 116, 120, 138, 174, 204, 222, 254; HKM 1994, S. 8, 18; HKM 2003, S. 38, 40).

Wie sich bei Analyse der Kursstrukturpläne (vgl. zuvor zitierte Stellen in Bader/Steiner 1994, HKM 1994 und HKM 2003) sowie ausgewählter Schulbücher für den Chemieunterricht in der Sekundarstufe II (Amann et al. 1989, S. 266 ff.; Asselborn/Jäckel/Risch 1998, S. 359 ff.; Risch/Seitz 1995, S. 118 ff.; Tausch/von Wachtendonk 1993, S. 52 ff.) ergab, werden in diesem Zusammenhang üblicherweise die nachstehend angegebenen fachwissenschaftlichen Themenschwerpunkte behandelt:

- Monosaccharide: Glucose und weitere Vertreter der Familie der D-Aldosen, Fructose;
- Halbacetalform, glykosidische Bindung, Mutarotation;
- Konfigurationsdarstellung mit Hilfe der Fischer- und Haworth-Projektionen; teilweise auch Erarbeitung von Sesselkonformationen;
- Disaccharide: Saccharose, Maltose und unter Umständen weitere wichtige Vertreter, wie z. B. Lactose und Cellobiose; experimentelle Unterscheidung reduzierender und nicht reduzierender Zucker;
- Polysaccharide: Stärke und Cellulose.

Neben den genannten fachbezogenen Inhalten sollen auch interdisziplinäre Aspekte, wie z. B. das Vorkommen, die biologischen Funktionen sowie die Verwendungsmöglichkeiten wichtiger Kohlenhydrat-Vertreter und deren ökonomische Relevanz thematisiert werden (Bader/Steiner 1994, S. 43, 77, 95). Auf der Basis des vorher im Chemieunterricht der Sekundarstufe II erarbeiteten Grundlagenwissens wäre es in diesem Zusammenhang möglich, zusätzlich zu den üblicherweise angesprochenen Polysacchariden Alginat zu behandeln.

Ausgehend von einer Betrachtung der Struktur der Alginat kann man mit den Lernenden deren charakteristische Eigenschaften erarbeiten und mit denen bereits bekannter Polysaccharid-Vertreter vergleichen. Auch die vereinfachte Isolierung von Rohalginat aus leicht zugänglichen Braunalgen (Experiment 9), bei der die Gelbildungsfähigkeit der Polyuronate mit Calcium-Ionen und Säure ausgenutzt wird, lässt sich ohne Probleme in der Schule realisieren. Einen zentralen Punkt bei der Behandlung der Alginat sollten deren vielfältige Einsatzmöglichkeiten im Alltag einnehmen. Hier bietet die vorliegende Arbeit zahlreiche Vorschläge für Experimente, die von den Schülern exemplarisch in Eigenarbeit durchgeführt werden können.

Strukturprinzipien und Eigenschaften von natürlichen und synthetischen Makromolekülen

Bei Lehrplananalysen lässt sich zudem feststellen, dass Unterrichtseinheiten über Kohlenhydrate zumeist nicht isoliert durchgeführt werden, sondern im Kontext eines übergeordneten Inhaltsbereiches stehen, in welchem neben den Aufbauprinzipien und Eigenschaften anderer polymerer Naturstoffe (z. B. der Proteine) unter Umständen auch diejenigen synthetischer Makromoleküle angesprochen werden (Bader/Steiner 1994, S. 174, 222, 242, 246; HKM 1994, S. 5, 18, HKM 2003, S. 38, 40). Daher vertreten beispielsweise Lutz/Müller (1991, S. 27) die Ansicht, dass „[...] Alginat [...] sich aufgrund ihrer Struktur-Eigenschafts-Beziehungen geradezu an[bieten], im Chemieunterricht eine Brücke zwischen Kohlenhydraten und Polymerchemie zu schlagen.“

Einige Möglichkeiten, die thematische Leitlinie „Korrelation Struktur und Eigenschaft“ (HKM 2003, S. 38, 40) am Beispiel der Alginat umzusetzen, seien nachfolgend ausgeführt:

Vergleicht man z. B. Cellulose mit dem anionischen Polysaccharid-Derivat Alginat, so wird deutlich, wie die Eigenschaften der ansonsten ähnlich aufgebauten Kohlenhydrate aufgrund der Präsenz anionischer Carboxylat-Funktionen völlig differieren. Während Cellulose in Wasser schwerlöslich ist, bilden Alginat in diesem Lösungsmittel hochviskose Sole, da die elektrostatische Abstoßung zwischen den polyanionischen Alginaten die Ausbildung von intermolekularen Wasserstoff-Brückenbindungen einschränkt. Außerdem bedingt die Carboxylat-Gruppe eine erhöhte Hydrophilie und somit bessere Solvatisierbarkeit der Algenpolysaccharid-Teilchen.

Eine weitere denkbare Vorgehensweise zur Verdeutlichung von Struktur-Eigenschafts-Beziehungen besteht in der Betrachtung der verschiedenen Alginat-Typen. Durch variierende Verknüpfung von Monomer-Bausteinen mit unterschiedlichen Konformationen (β -D-Mannuronat: 4C_1 ; α -L-Guluronat: 1C_4) entstehen Makromoleküle, die in ihrem räumlichen Aufbau stark voneinander abweichen: Während MM-Sequenzen flache Bänder bilden, verfügen GG-Blöcke über Hohlraum-Strukturen. Alternierende Abschnitte (MG oder GM) hingegen liegen in Form unregelmäßiger Zick-Zack-Ketten vor (vgl. Theoretischer Teil, Kapitel 2.2.1). Mit dieser strukturellen Varianz gehen Unterschiede in den physikalisch-chemischen Eigenschaften einher: So sind beispielsweise nur die GG-Sequenzen in der Lage, durch Einlagerung von Calcium-Ionen Gele zu bilden.

Auch vergleichende Untersuchungen zwischen Alginat-Polyanionen und Propylenglykolalginat können in diesem thematischen Zusammenhang von Bedeutung sein. Durch Veresterung der Carboxyl-Gruppen mit Propylenoxid entstehen Makromoleküle mit amphiphilem Aufbau: Diese sind aufgrund ihres polaren Polysaccharid-Gerüsts sehr gut wasserlöslich, verfügen aber gleichzeitig über lipophile Ester-Gruppen. Im Gegensatz zu Algi-

naten wirken Propylenglykolalginat daher in dispersen Systemen nicht nur als Verdickungsmittel und Schutzkolloide, sondern stellen echte Emulgatoren dar.

Lebensmittel

Eine Auseinandersetzung mit den Einsatzmöglichkeiten von Alginaten als Verdickungs- und Geliermittel in Nahrungsmittelprodukten könnte z. B. im Rahmen der Kursthemen „Lebensmittel“ (HKM 1994, S. 14) „Nahrungsmittel“ (HKM 2003, S. 47) oder „Lebensmittelchemie“ (Bader/Steiner 1994, S. 174) erfolgen.

In derartigen Unterrichtseinheiten ist häufig die Beschäftigung mit Lebensmittelzusatzstoffen und künstlichen Lebensmitteln vorgesehen (Bader/Steiner 1994, S. 174, HKM 2003, S. 47). In diesem thematischen Zusammenhang sind die in der Arbeit vorgestellten Versuche zu den Anwendungen der Alginat in der Lebensmittelindustrie sinnvoll einsetzbar (vgl. auch Kapitel 2.6.2 des Theoretischen Teils):

Die Experimente 10 und 12 verdeutlichen am Beispiel eines Salatdressings, wie Alginat und PGA durch ihre verdickende sowie emulsions- und suspensionsstabilisierende Wirkung die Phasenseparation in Systemen mit nicht miteinander mischbaren Komponenten unterbinden können.

Mit der Herstellung restrukturierter Paprikastreifen (Experiment 11) wird ein immer mehr an Bedeutung gewinnendes Verfahren aus dem Bereich der Lebensmitteltechnologie angesprochen, mit dessen Hilfe die Formgebung von Nahrungsmittelprodukten unter Ausnutzung der Gelbildungsreaktion von Alginat-Polyanionen mit Calcium-Ionen erfolgen kann. Durch die Beschäftigung mit der Rekonstituierung von Lebensmitteln erhalten die Schüler auf exemplarische Weise einen Einblick in die komplexen chemischen, physikalischen und technologischen Vorgänge, auf denen die besondere Beschaffenheit unserer Fertignahrungsmittel basiert.

Biotechnologie

Die Anwendung von Calciumalginat-Gelen für die Immobilisierung von Biokatalysatoren gehört wohl zu den zukunftsreichsten Einsatzmöglichkeiten dieses Algenpolysaccharids. So werden Immobilisate von Hefe-Zellen in Calciumalginat-Kugeln bereits im Technikums-Maßstab für die Ethanol-Produktion sowie für die Herstellung flaschenvergorener Schaumweine genutzt.

Die Tatsache, dass diese Thematik durchaus als relevant für den schulischen Chemieunterricht angesehen wird, lässt sich durch die Existenz mehrerer fachdidaktischer Veröffentlichungen dokumentieren (vgl. z. B. Grunwald 1986, S. 775 f.; Hobein/Lutz 1987, S. 20 ff.; Itzek/Schallies 1996, S. 448 ff., Labahn-Lucius 1990, S. 109 ff.; Labahn-Lucius 1991, S. 36 f.; Lutz/Müller 1992, S. 21 f.; Scharf 1987, S. 37 f.; Wenck/Maerz 1987, S. 17 ff.).

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst eine Methode zur Immobilisierung von Hefe in Calciumalginat-Gel vorgestellt (Experiment 13). Die Gärleistungen der dabei erhaltenen Hefe-Immobilisate können dann qualitativ nachgewiesen oder in einem quantitativen bzw. halbquantitativen Versuch mit denen freier Hefe-Zellen verglichen werden (Experiment 14, 15 und 16). Diese Grundlagenversuche lassen sich im Chemieunterricht zumindest im Leistungskurs-Bereich ohne Probleme realisieren.

Die zur Optimierung der Ethanol-Produktion einsetzbaren Calciumalginat-Hefe-Zylinder, die mit relativ hohem Zeit- und Materialaufwand durch interne Gelbildung hergestellt werden (vgl. Experiment 17), sind für den Einsatz im regulären Unterricht weniger geeignet. Die Beschäftigung mit diesem Themenkomplex wäre aber z. B. im Rahmen von Arbeitsgemeinschaften, Projekten oder Facharbeiten möglich.

Des Weiteren wird anhand eines einfachen Versuches aufgezeigt, wie die Fermentationskosten für Gärungsalkohol durch Einsatz von Abfallstoffen möglichst niedrig gehalten werden können. So lässt sich z. B. die bei der Käseherstellung im Tonnenmaßstab anfallende Molke, die das von den meisten Hefe-Stämmen nicht metabolisierbare Disaccharid Lactose enthält, mit Coimmobilisaten von Hefe und dem lactosespaltenden Enzym β -Galactosidase zu Kohlenstoffdioxid und Ethanol vergären (vgl. Experiment 19). Die kovalente Kopplung von β -Galactosidase an Alginat (Experiment 18) ist im schulischen Rahmen aus Kosten- und Zeitgründen allerdings nicht durchführbar, obwohl die chemischen Hintergründe dieses Versuches – auch wegen ihrer mechanistischen Analogien zur Peptid-Synthese – sehr interessant sind.

Schließlich wird in der Arbeit noch die Einsatzmöglichkeit von Calciumalginat-Hefe-Immobilisaten für die Herstellung flaschenvergorener Schaumweine angesprochen. Da die Sektheife in diesen Immobilisat-Kugeln eingeschlossen ist, kann sie nach erfolgter Gärung viel unproblematischer und vollständiger aus der Schaumwein-Flasche abgetrennt werden als die üblicherweise verwandten freien Hefe-Zellen. Auf diese Weise lassen sich kosten- und zeitaufwändige Klärungsverfahren, die bei der traditionellen Flaschengärung erforderlich sind, umgehen. Zur Veranschaulichung dient hier ein Modellversuch (Experiment 21), in dem die Schüler selbst Hefe-Zellen in Calciumalginat-Kugeln immobilisieren und auf ihre Tauglichkeit für die Schaumwein-Produktion untersuchen können. Das Verfahren zur Herstellung von Spezialimmobilisaten mit zellfreien Hüllschichten (Experiment 20) macht zwar sehr gut die Möglichkeiten zur Reduktion der Hefe-Kontamination im Schaumwein deutlich, ist aber für den Einsatz im regulären Chemieunterricht apparativ und zeitlich zu aufwändig. Eine Auseinandersetzung mit dieser Problematik könnte aber z. B. in Arbeits- oder Projektgruppen erfolgen.

Die Inhalte, die mit den Einsatzmöglichkeiten von Calciumalginat-Hefe-Immobilisaten für die biotechnologische Ethanol-Gewinnung verknüpft sind, lassen sich in Unterrichtsreihen über Alkanole integrieren, wo neben synthetischen auch biochemische Verfahren zur Ethanol-Herstellung besprochen werden sollen (HKM 1994, S. 10; HKM 2003, S. 31). Denkbar wäre zudem eine Behandlung im Rahmen biochemischer Themen (Bader/Steiner 1994, S. 56, 64; HKM 1994, S. 12, 18 f.), z. B. bei der Besprechung der ethanolischen Gärung. In diesem Zusammenhang wird es für wichtig gehalten, dass die Schüler sich nicht nur mit den fachlichen Grundlagen der Biokatalyse auseinandersetzen, sondern auch bedeutende Verwendungszwecke enzymatisch aktiver Materialien in der Biotechnologie kennen lernen (Bader/Steiner 1994, S. 56 f.). Vor diesem Hintergrund ist es möglich, die Einsetzbarkeit von in Calciumalginat immobilisierten Hefe-Zellen für die biotechnologische Ethanol-Produktion und die Schaumwein-Herstellung zu thematisieren.

Neben der Immobilisierung von Zellen in Calciumalginat-Gel wird auch der Matrixeinschluss von Enzymen in diesem Trägermaterial angesprochen:

Die kovalente Bindung von β -Galactosidase an Alginat mit anschließendem Matrixeinschluss in Calciumalginat-Gel (vgl. Experiment 22) erfordert einen Material- und Zeitaufwand, der im Chemieunterricht nicht erbracht werden kann. Dasselbe gilt für die photometrische Untersuchung der enzymatischen Aktivität derart hergestellter Immobilisate (Experiment 23).

Die vereinfachten Versuche zur Immobilisierung von β -Galactosidase in Calciumalginat-Kugeln und zur Anwendung des trägerfixierten Enzyms für die Lactose-Hydrolyse in Milch und Molke (Experiment 24 a) – d)) sind aber durchaus für die Realisierung in der Schule geeignet. Am Beispiel eines alltagsorientierten Modellsystems können hier die Lernenden die Möglichkeiten und Grenzen der Enzym-Immobilisierung experimentell und theoretisch erarbeiten.

Medizin und Pharmazie

Wundauflagen, Dentalabdruckmassen und Therapeutika gegen Sodbrennen sind alltagsorientierte Beispiele für die medizinisch-pharmazeutischen Anwendungen von Alginaten (vgl. Experimente 25 – 29). Die Wirkungsmechanismen dieser Produkte können unter anderem in Unterrichtsreihen über die „Carboxyl-Gruppe und ihre Reaktionen“ behandelt werden, wo neben rein fachwissenschaftlichen auch technische und anwendungsorientierte Aspekte, wie z. B. die Einsatzmöglichkeit von Carbonsäuren und ihren Derivaten als Arzneimittel, angesprochen werden sollen (HKM 1994, S. 18).

Gerade die Versuche zu den Anwendungen von Alginaten und Alginsäure auf dem medizinisch-pharmazeutischen Sektor bieten aber Verknüpfungspunkte zu einer Vielzahl weiterer fachwissenschaftlicher und interdisziplinärer Inhalte des Chemieunterrichtes in der Sekundarstufe II. Dies soll an zwei Beispielen genauer erläutert werden.

Um das Abbinden von Dentalabdruckmassen auf Alginat-Basis (Experimente 26 und 27) zu erklären, ist die Betrachtung mehrerer miteinander verknüpfter Fällungs-, Säure-Base- und Sol-Gel-Gleichgewichte erforderlich. Die Beschäftigung mit einem solchen System bietet also die Möglichkeit, auf alltagsorientierte Weise grundlegende Inhalte des Chemieunterrichts, wie z. B. Massenwirkungsgesetz, Prinzip von Le Chatelier, Säure-Base-Theorien und wichtige Aspekte der makromolekulare Chemie zu vernetzen und auf neue Probleme anzuwenden.

Ähnliches trifft auch auf den Versuch zur Herstellung alginathaltiger Arzneimitteln gegen Sodbrennen (Experiment 28) zu. Wie bereits in Kapitel 2.6.4.4 des Theoretischen Teils erläutert wurde, enthalten diese Medikamente als Hauptkomponenten Natriumalginat, KHCO_3 und CaCO_3 . Bei Kontakt mit der Magensäure bildet sich ein CO_2 -haltiger Alginsäure-Schaum, der bei saurem Reflux als Schutzbarriere fungiert. Um die Wirkungsweise zu deuten, müssen sich die Lernenden auch hier mit verschiedenen konkurrierenden Säure-Base- und Löslichkeits-Gleichgewichten auseinandersetzen. Wichtige Konzepte und Begriffe können also auf anwendungsorientierte Weise wiederholt und vertieft werden.

Des Weiteren wird modellhaft die Einsatzmöglichkeit von Calciumalginat als *In-vivo*-Austauscher für radioaktives $^{90}\text{Sr}^{2+}$ verdeutlicht (vgl. Experiment 30). Dieser Versuch ist ebenfalls von Interesse für den Chemieunterricht, da viele grundlegende fachliche und fächerübergreifende Inhalte, wie z. B. Ionenaustausch, Komplexbildung, Metall-Analytik und Modelldenken, thematisiert werden. Dadurch, dass das komplexe Reaktionsgeschehen des *In-vivo*-Austausches von $^{90}\text{Sr}^{2+}$ in stark vereinfachter Weise *in vitro* nachvollzogen wird, bleiben die ablaufenden Prozesse für die Lernenden durchschaubar.

Die radiochemischen Hintergründe des Modellexperimentes zur medizinischen Verwendung von Calciumalginat als *In-vivo*-Austauscher für ^{90}Sr sind auch von Relevanz für Einheiten über Kernchemie, die für den Leistungskursunterricht in einigen Bundesländern vorgeschrieben sind (Bader/Steiner 1994, S. 44, 61).

Chemie des Alltags

Die mit der Behandlung von Alginaten verknüpften Inhalte sind vor allem auch insofern als relevant für den Chemieunterricht einzuschätzen, als man – meist ohne sich dessen bewusst zu sein – im täglichen Leben eine Vielzahl von Produkten benutzt, die diese Alginatpolysaccharide enthalten.

Dies soll im Folgenden am Beispiel der Alginat-Anwendungen in der Lebensmittelindustrie verdeutlicht werden:

Chemieunterricht kann einen wichtigen Beitrag zur Allgemeinbildung leisten, wenn er den Lernenden vor Augen führt, dass häufig konsumierte Alltagsprodukte (Fertig-Desserts, Eis, Salatdressings, gefüllte Oliven etc.) nicht per se die gewünschte Beschaffenheit haben, sondern gezielt durch Zusatz von Verdickungs- und Geliermitteln sowie Stabilisato-

ren, zu denen z. B. auch Alginat gehören, in ihrer Konsistenz und Stabilität beeinflusst werden.

Dabei sollte man den Schülern anhand geeigneter Experimente und Modelle verständlich machen, wie bestimmte makroskopische Eigenschaften (z. B. gelartige Konsistenz) mit Zuständen und Vorgängen im submikroskopischen Bereich (z. B. Zusammenlagerung von Algenpolysaccharid-Molekülen mit besonderer Struktur zu höheren Assoziaten) zusammenhängen. Auf diese Weise lernen sie gleichzeitig wichtige chemische und fächerübergreifende Inhalte und Prinzipien kennen.

Ein weiterer Vorzug einer solchen Vorgehensweise liegt auf der Hand: Es ist einfach spannend, im Chemieunterricht experimentell und theoretisch Fragen nachzugehen, die uns alle schon einmal beschäftigt haben: „Wie kommt es, dass die Kräuter in käuflichen Salatdressings in der Schwebe gehalten werden?“ „Woraus bestehen eigentlich die Paprikastreifen in gefüllten Oliven?“

Das Aufgreifen, Hinterfragen und Untersuchen von Phänomenen aus der Lebenswirklichkeit der Lernenden ist aber nicht nur von Bedeutung, weil es die Schülermotivation verbessert, sondern auch, weil es die Voraussetzung für die Realisierung eines praxisnahen Chemieunterrichts darstellt (Lutz 1996, S. 70 ff.).

Bezüge zu weiteren fachlichen Inhalten des Chemieunterrichts

Wie in Abbildung 91 angedeutet wird, bietet die Behandlung von Alginaten im Chemieunterricht zudem die Möglichkeit, weitere grundlegende fachwissenschaftliche Inhalte zu vertiefen und das dabei erworbene Wissen auf neue Probleme anzuwenden. Dazu gehören unter anderem:

- Koordinationsverbindungen (Komplexverbindungen) (HKM 1994, S. 4; HKM 2003, S. 51);
- Kationenaustausch (Asselborn/Jäckel/Risch 1998, S. 200, 218; Risch/Seitz 1995, S. 37 f.);
- Kolloide (Asselborn/Jäckel/Risch 1998, S. 329; Risch/Seitz 1995, S. 175);
- Aufbau, Eigenschaften und Anwendungen grenzflächenaktiver Stoffe (HKM 1994, S. 12, 18; HKM 2003, S. 47).

Aspekte der Komplexchemie können im Zusammenhang mit der Gelbildung von Alginat-Polyanionen mit Calcium-Ionen thematisiert werden.

Die Kationenaustauscheigenschaften der Algenpolysaccharide werden z. B. bei der Alginat-Gewinnung aus Braunalgen sowie bei der Dekorporierung von radioaktivem Strontium ausgenutzt. Eine besonders große Rolle spielen sie aber für das im Rahmen der Arbeit entwickelte Verfahren zur quantitativen Erdalkalimetall-Bestimmung mit Alginsäure im Säulenbetrieb (vgl. Experiment 31). Dieser Versuch ist durchaus auch in der Schule realisierbar und bietet interessante Ansatzpunkte für Facharbeiten, in denen die Schüler selbst-

ständig Erkenntnisse über Gleichgewichtsbeeinflussungen durch Konzentration sowie Veränderung der Säulenkapazität und Tropfgeschwindigkeit gewinnen können.

Ungefährliche, leicht durchführbare und spannende Experimente

Abschließend sei noch erwähnt, dass die Experimente zu den charakteristischen Eigenschaften, der Gewinnung und den Anwendungen von Alginaten für den schulischen Chemieunterricht auch aufgrund ihrer Ungefährlichkeit geeignet sind. Aus rechtlicher und sicherheitstechnischer Sicht ist für alle Versuche die Realisierung in Form von Schülerexperimenten zulässig (BUK 2000 a, S. 19 f.; BUK 2000 b, S. 11 ff.).

Die meisten Versuche sind zudem leicht durchführbar und erfordern relativ wenig apparativen Aufwand. Und *last but not least*: Sie sind für Schüler und Lehrer gleichermaßen neu und faszinierend.

4.1.2 Carrageenane

Wie aus Abbildung 92 ersichtlich ist, sind die fachdidaktische Überlegungen zur Behandlung von Alginaten im Chemieunterricht in großen Teilen auf Carrageenane übertragbar.

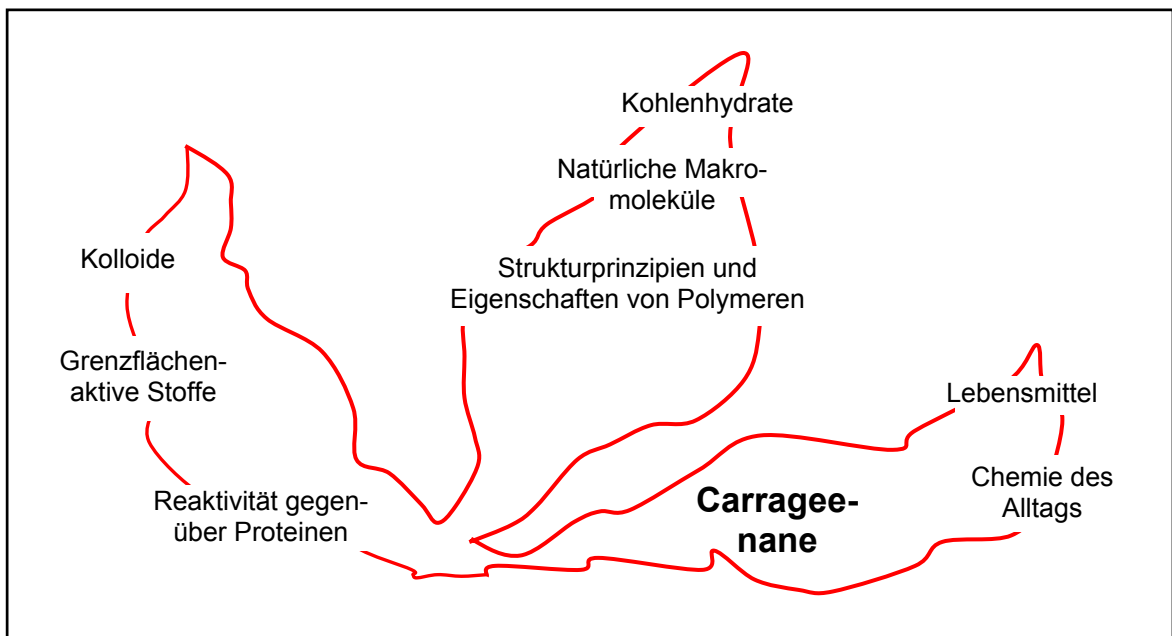


Abb. 92: Behandlung des Themas „Carrageenane“ im Chemieunterricht.

Kohlenhydrate

In Analogie zu Alginaten können Carrageenane als Erweiterung und Vertiefung in Unterrichtseinheiten über Kohlenhydrate behandelt werden. In der vorliegenden Arbeit werden Versuche vorgestellt, die es den Schülern ermöglichen, auf vereinfachte Weise Carrageenane aus Rotalgen zu gewinnen (Experiment 42), deren Eigenschaften kennenzulernen (Experimente 36 – 40) und sich exemplarisch mit deren vielseitigen Anwendungen im Alltag zu beschäftigen (Experimente 43 – 48).

Strukturprinzipien und Eigenschaften von natürlichen und synthetischen Makromolekülen

Auch für die Auseinandersetzung mit Struktur-Eigenschafts-Beziehungen von Polymeren sind die Rotalgenpolysaccharide gut geeignet. Beispielhaft seien in diesem Zusammenhang die Unterschiede im chemischen Aufbau und der Struktur der drei Carrageenarten κ , ι und λ genannt, die das stark divergierende Löslichkeits- und Gelbildungsverhalten dieser Makromoleküle bedingen. Da strukturelle Betrachtungen der Carrageenane auch für Schüler mit guten Vorkenntnissen über Kohlenhydrate relativ komplex sind, ist es ratsam, zur Veranschaulichung die betrachteten Moleküle nachzubauen und zur Klärung der Gelbildungsvorgänge die in dieser Arbeit vorgestellten Modelle heranzuziehen.

Carrageenane in Lebensmitteln – Alltagsbedeutung

Ein aufmerksamer Blick in die Lebensmittelregale eines Supermarktes macht sehr schnell deutlich, wie häufig wir Produkte verzehren, die Carrageenane (E 407) enthalten. Das Anwendungsspektrum reicht von Salatdressings und Soßen über Tortenguss und Instant-Götterspeise bis hin zu kalorienreduzierten Puddings und Milchgetränken. Trotz dieser Tatsache ist außerhalb von Expertenkreisen nur wenig darüber bekannt, was sich hinter dem Begriff „Carrageenane“ verbirgt.

Daher wurden in dieser Arbeit Versuche entwickelt, die die Einsatzmöglichkeiten von Carrageenanen in Lebensmittelprodukten auf Wasser- und Milchbasis thematisieren:

Experiment 43 zeigt am Beispiel von ölhaltigen Salatdressings mit Kräutern, wie die Polysaccharid-Derivate aus Rotalgen als Emulsions- und Suspensionsstabilisatoren in Nahrungsmitteln mit nicht miteinander mischbaren Komponenten eingesetzt werden können.

Des Weiteren wird in der Arbeit eine lebensmittelanalytische Methode vorgestellt, mit der sich die in wässrigen Lebensmittelerzeugnissen enthaltenen Carrageenane durch eine Farbreaktion mit Methyleneblau qualitativ nachweisen lassen. Nach Durchführung weniger Aufbereitungsschritte lassen sich auf diese Weise die Salatdressings als Suspensionsstabilisatoren sowie Tortenguss und Instant-Götterspeise als Geliermittel zugesetzten Carrageenane identifizieren (vgl. Experimente 44 a) – c))

In einem weiteren Versuch wird ein vereinfachtes Verfahren zur Produktion carrageenanhaltiger Fruchtgummis präsentiert, mit dem man hofft, den Gelatine-Einsatz in diesen Süßwaren umgehen zu können (vgl. Experiment 45).

Mit der Funktion der Algenpolysaccharide in Milchprodukten beschäftigen sich die Experimente 46 – 48 der vorliegenden Arbeit. Die Bearbeitung dieses Themenkomplexes bietet eine gute Möglichkeit, fachwissenschaftliche Aspekte der Polysaccharid- und Protein-Chemie mit anwendungsbezogenen und alltagsorientierten lebensmittelchemischen Inhalten zu verknüpfen:

Zunächst wird ein Grundlagenversuch vorgestellt, mit dem sich die pH-abhängige Reaktion von Carrageenanen mit Proteinen näher untersuchen lässt (vgl. Experiment 46).

In Experiment 47 wird dann gezeigt, dass die besonders hohe Gelbildungsfähigkeit von Carrageenanen in Milchsystemen nicht allein durch die in Milch enthaltenen gelbildenden Kationen bedingt ist, sondern ihre Ursache in der Interaktion der Polysaccharid-Derivate mit bestimmten Milchproteinen, den Caseinen, hat.

Die Reaktion von κ -Carrageenan mit den Caseinen der Milch stellt die Grundlage für wichtige alltagsrelevante Anwendungen dieses Algenpolysaccharids in der Lebensmittelindustrie dar. So ist z. B. in käuflichen Kakaotränken κ -Carrageenan als Stabilisator enthalten. Wie in Experiment 48 deutlich wird, setzt man hier das Polysaccharid-Derivat in so geringer Konzentration ein, dass die entstehenden κ -Carrageenan-Casein-Gele gerade stark genug sind, um ein schnelles Absinken der Kakao-Partikel zu verhindern. Trotz dieser Tatsache behalten die Kakaotränke ihre augenscheinlich flüssige Konsistenz. Daher eignet sich diese alltagsrelevante Anwendungsmöglichkeit von κ -Carrageenan besonders gut dafür, den Lernenden auf exemplarische Weise bewusst zu machen, wie komplex die chemischen und physikalischen Vorgänge sind, die das äußere Erscheinungsbild unserer Fertiglernmittel hervorrufen.

Eine Auseinandersetzung mit lebensmitteltechnologischen Aspekten von Carrageenanen ist wie bei Alginaten im Rahmen der Kursthemen „Lebensmittel“ (HKM 1994, S. 14), „Nahrungsmittel“ (HKM 2003, S. 47) oder „Lebensmittelchemie“ (Bader/Steiner 1994, S. 174) möglich. Im Kontext einer lebensmittelchemischen Unterrichtseinheit lassen sich sowohl Methoden und Probleme der „Lebensmittelanalytik“ (HKM 1994, S. 18) als auch funktionelle und anwendungstechnische Aspekte thematisieren. Eine gute Ergänzung zu den anwendungsbezogenen Experimenten stellen dabei die Grundlagenversuche zum Sol- und Gelbildungsverhalten sowie zur emulsions- und suspensionsstabilisierenden Wirkung von Carrageenanen dar (vgl. Experimente 37 b), 39 und 40).

Zusätzlich zu den genannten fachwissenschaftlichen Inhalten sollten auch wichtige interdisziplinäre Gesichtspunkte, wie z. B. die Kennzeichnung von Zusatzstoffen nach Lebensmittelrecht sowie deren physiologische und toxische Wirkung, angesprochen werden.

Bezüge zu weiteren fachlichen Inhalten des Chemieunterrichts

Wie Abbildung 92 zu entnehmen ist, können bei der Behandlung des Themas „Carrageenane“ Bezüge zu weiteren wichtigen Inhalten des Chemieunterrichts geknüpft werden. Dabei handelt es sich z. B. um

- Kolloide (Asselborn/Jäckel/Risch 1998, S. 329; Risch/Seitz 1995, S. 175) sowie
- grenzflächenaktive Stoffe (HKM 1994, S. 12, 18; HKM 2003, S. 47).

Wiederum besteht hier die Möglichkeit, bereits in diesen Bereichen erworbene Kenntnisse zu vertiefen und auf neue Problemstellungen anzuwenden.

Ungefährliche, leicht durchführbare und spannende Experimente

Aufgrund ihrer Ungefährlichkeit und einfachen Durchführbarkeit sind die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche zum Thema „Carrageenane“ ebenfalls alle als Schülerübungen geeignet (BUK 2000 a, S. 19 f.; BUK 2000 b, S. 11 ff.). Den Lernenden wird so ermöglicht, sich selbständig mit interessanten Alltagsphänomenen auseinanderzusetzen und diese chemisch zu hinterfragen.

4.1.3 Abschließende Einschätzung

Wie im Vorangehenden aufgezeigt wurde, weist die Alginat- und Carrageenan-Chemie zahlreiche Berührungspunkte mit zentralen fachwissenschaftlichen, interdisziplinären und allgemeinbildenden Inhalten des Chemieunterrichts auf. Die Beschäftigung mit diesen beiden Algenpolysacchariden ermöglicht es den Lernenden, zuvor erworbene Kenntnisse auf alltagsorientierte Weise zu vertiefen und auf neue Problemstellungen anzuwenden.

Dass die Auseinandersetzung mit Alginaten und Carrageenanen auch in der Praxis als ein für den schulischen Chemieunterricht relevanter Inhalt angesehen wird, lässt sich sowohl durch die Reaktionen auf fachdidaktische Veröffentlichungen als auch durch das Interesse an Vorträgen, Lehrerfortbildungskursen und Schülerworkshops zu diesem Themenkomplex dokumentieren. Die schulbezogenen Veranstaltungen, die während der Anfertigung dieser Arbeit von der Verfasserin durchgeführt wurden, sind in Tabelle 60 zusammengestellt.

Tab. 62: Alginate und Carrageenane im Chemieunterricht – Veranstaltungen.

Veranstaltung	Referenzen	Ort	Datum
<u>Vorträge</u> Alginate – Algenpolysaccharide mit vielfältigen Anwendungen im Alltag, Vortrag bei der 30. Hessischen Landestagung des Deutschen Vereins zur Förderung des mathematischen und naturwissenschaftlichen Unterrichtes (MNU)	Marburger	Hörsaalgebäude der Philipps-Universität Marburg	05.09.01
<u>Lehrerfortbildungskurse</u> Alginate und Carrageenane – Algenpolysaccharide mit interessanten Eigenschaften und vielfältigen Anwendungen, Lehrerfortbildungskurs, Teil 1 (gefördert durch die GDCh)	Marburger/ Rickelt/ Schween	FB Chemie der Philipps-Universität Marburg	06.03.01
Alginate – Gewinnung aus Braunalgen und Verwendung in der Lebensmittelindustrie, Biotechnologie und Medizin, Lehrerfortbildungskurs, Teil 2 (gefördert durch die GDCh)	Marburger/ Rickelt/ Schween	FB Chemie der Philipps-Universität Marburg	14.03.01
Carrageenane – Gewinnung aus Rotalgen, Anwendung in der Lebensmittelindustrie, Nachweis in Nahrungsmitteln, Lehrerfortbildungskurs, Teil 3 (gefördert durch die GDCh)	Marburger/ Rickelt/ Schween	FB Chemie der Philipps-Universität Marburg	22.03.01
Alginate – Algenpolysaccharide mit interessanten Eigenschaften und vielfältigen Anwendungen im Alltag, Lehrerfortbildungskurs des Lehrerfortbildungszentrums Bremen/Oldenburg	Marburger	Ubbo-Emmius-Gymnasium, Leer	04.02.03
<u>Schülerworkshops</u> Alginate und Carrageenane – Experimente zu den Eigenschaften, der Gewinnung und den Anwendungen dieser Algenpolysaccharide, Schülerworkshop mit zwei Leistungskursen des Gymnasiums Philippinum, Marburg	Marburger/ Rickelt/ Schween	FB Chemie der Philipps-Universität Marburg	30.08.01
Food Design mit Alginaten, Experiment im Rahmen des Schülerworkshops des Fachbereichs Chemie 2002	Marburger/ Rickelt	FB Chemie der Philipps-Universität Marburg	19.02. – 20.02.02
Alginate – Algenpolysaccharide mit interessanten Eigenschaften und vielfältigen Anwendungen im Alltag, Schülerworkshop mit einem Leistungskurs der Kurt-Schumacher-Schule, Karben	Marburger/ Rickelt	FB Chemie der Philipps-Universität Marburg	11.04.02
Alginate – Eigenschaften, Gewinnung und Anwendung in Lebensmitteln und Medikamenten, Schülerworkshop mit einer 10. Klasse der Martin-Luther-Schule, Marburg	Marburger/ Rickelt	FB Chemie der Philipps-Universität Marburg	03.07.03

Dass Algenpolysaccharide besonders im Bereich der Sekundarstufe II als geeignet für die selbständige Beschäftigung von fortgeschrittenen Schülern mit einem Themengebiet anzusehen sind, zeigt sich z. B. auch darin, dass inzwischen vermehrt Facharbeiten zu Alginaten und Carrageenanen angefertigt werden. In diesem Zusammenhang behandelte Schwerpunkte sind u. a. die Restrukturierung von Lebensmitteln, die Herstellung alginat-

haltiger Dentalabdruckmasen, der Einsatz von Carrageenanen als Lebensmittelzusatzstoffe sowie die Kationenaustauscheigenschaften von Alginaten.

Des Weiteren liegen bereits erste Erfolgsberichte über Unterrichtsreihen und Abituraufgaben zu den Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten von Alginaten vor.

4.2 Alginat und Carrageenane im universitären Bereich

Für nahezu alle der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Experimente bestehen zudem Einsatzmöglichkeiten im universitären Bereich, von denen im Folgenden einige exemplarisch genannt seien:

Es existiert beispielsweise bereits ein Laborhandbuch über Experimentelle Phykologie, in welchem einfache Versuche zur Gewinnung von Alginsäure und Rohcarrageenan aus Braun- bzw. Rotalgen beschrieben werden (vgl. Vandermeulen 1988, S. 164 ff.; Whyte 1988, S. 168 ff.). In einem solchen Rahmen könnten auch die in dieser Arbeit entwickelten Verfahren zur Gewinnung von Alginsäure aus *Laminaria*-Spezies und *Fucus vesiculosus* (Experimente 7 a) und b)) sowie die Labormethode zur Isolierung von Carrageenan aus verschiedenen Rotalgenarten (Experiment 41) durchgeführt werden, die für die Realisierung in der Schule apparativ und zeitlich zu aufwändig sind.

Die Versuche, welche der Veranschaulichung der Funktion von Alginaten und Carrageenanen als Verdickungs- und Geliermittel in Nahrungsmittelerzeugnissen dienen (vgl. Grundlagenexperimente 4, 5, 6, 37, 39 und 40 sowie Anwendungsexperimente 10, 11, 12, 43, 44, 45, 47 und 48) sind zudem von potenzieller Relevanz für die praktische Ausbildung von Ernährungswissenschaftlern, Lebensmitteltechnologern und -chemikern.

Auch für die biotechnologischen Inhalte der vorliegenden Arbeit gibt es Umsetzungsmöglichkeiten im Hochschulbereich: Wie aus im Internet veröffentlichten Versuchsvorschriften zur Immobilisierung von Biokatalysatoren in Matrices aus Calciumalginat hervorgeht (Wang 1998 a, b), werden derartige Experimente in einem Praktikum für Chemieingenieure an der Universität von Maryland durchgeführt. Ähnliche Einsatzzwecke wären auch für die biotechnologischen Versuche denkbar, die in dieser Arbeit konzipiert wurden (vgl. Experimente 13, 14, 15, 16, 17, 18 und 20). In einem solchen Kontext könnten auch die Versuche zur kovalenten Bindung von Enzymen an Alginat sowie zur photometrischen Bestimmung der Aktivität freier und trägerfixierter Enzyme Verwendung finden, die in der Schule aus Kosten- und Zeitgründen nicht realisierbar sind (vgl. Experimente 22 und 23).

Nicht zuletzt eignet sich auch die in der Arbeit neu entwickelte Methode zur quantitativen Bestimmung von Erdalkalimetall-Kationen mit Alginsäure-Austauschern (Experiment 31) für den Einsatz im universitären Praktikumsbetrieb. Dieser Versuch ermöglicht es den Lernenden, einen Kationenaustauscher selbst herzustellen, für analytische Zwecke aufzubereiten und auf ein Bestimmungsproblem anzuwenden.

C SCHLUSSBETRACHTUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte eine umfassende Auseinandersetzung mit zwei noch relativ unbekanntem, aber in Wissenschaft, Industrie und Alltag immer mehr an Bedeutung gewinnenden Algenpolysacchariden – den Alginaten und Carrageenenen.

Ausgehend von einer Diskussion des chemischen Aufbaus und der Struktur der beiden Polysaccharid-Derivate wurden zunächst deren wichtigste charakteristische Eigenschaften betrachtet. Dazu gehören vor allem die besondere Sol- und Gelbildungsfähigkeit sowie die emulsions- und suspensionsstabilisierende Wirkung von Alginaten und Carrageenenen. Zu diesem Themenkomplex wurden Grundlagenexperimente entwickelt, die das physikalisch-chemische Verhalten der Algenpolysaccharide veranschaulichen (vgl. Experimente 1 – 6 und 36 – 40).

Dadurch konnte die Basis für das Verständnis der chemischen und prozesstechnischen Vorgänge geschaffen werden, die mit der industriellen Gewinnung von Alginaten und Carrageenenen aus Braun- bzw. Rotalgen im Zusammenhang stehen:

Im Rahmen der Arbeit erfolgte die Entwicklung und Optimierung von Labormethoden zur Extraktion von Alginsäure aus *Laminara*-Spezies und *Fucus vesiculosus*, mit denen das Algenpolysaccharid in ausreichend reiner Form erhalten wird (Experimente 7 a) und b)). Diese Versuche orientieren sich möglichst eng an den in der Industrie angewandten Produktionsverfahren, sind aber gleichzeitig so angelegt, dass deren Durchführung keinen für den Labormaßstab inakzeptabel hohen apparativen und zeitlichen Aufwand erfordert. Analoges gilt auch für die in der Arbeit entwickelte Versuchsvorschrift zur Isolierung von Carrageenan aus *Chondrus crispus*, *Gigartina radula* und *Euचेuma cottonii* (Experiment 41).

Gleichzeitig wurden für beide Polysaccharid-Derivate vereinfachte Versuchsvarianten zur Gewinnung aus leicht beschaffbaren Braun- bzw. Rotalgen konzipiert (Experimente 9 und 42). Mit minimalem Geräte- und Zeitbedarf ermöglichen diese Versuche die Isolierung von Rohalginat- bzw. -carrageenan aus den Herkunftspflanzen und die anschließende Überprüfung der charakteristischen Gelbildungseigenschaften der Produkte. Sie sind daher besonders für den Einsatz im Chemieunterricht geeignet.

Im Anschluss an die Diskussion der Gewinnungsmethoden fand eine eingehende Beschäftigung mit ausgewählten Anwendungsmöglichkeiten der beiden Algenpolysaccharide statt. Dabei bestand ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit darin, bereits existierende alltagsrelevante und zukunftssträchtige Einsatzbeispiele der Alginat- und Carrageenane aufzugreifen, bezüglich ihrer chemischen Hintergründe zu untersuchen und in möglichst einfache und anschauliche Versuche umzusetzen, die im schulischen Rahmen realisiert werden können. Die in diesem thematischen Kontext entwickelten Experimente werden in Tabelle 63 im Überblick dargestellt.

Tab. 63: Im Rahmen der Arbeit entwickelte Versuche zu den Einsatzzwecken von Alginaten und Carrageenanen im Alltagsleben.

Einsatzbereich des Algenpolysaccharids im Alltag	Veranschaulichter Themenschwerpunkt	Experiment ^a
<u>Alginat</u> Lebensmittelindustrie	Stabilisierung von ölhaltigen Salatdressings mit Natriumalginat und PGA	10, 12
	Restrukturierung von Lebensmitteln	11
Biotechnologie	Ethanol-Gewinnung mit in Calciumalginat eingeschlossener Hefe	13, 14, 15, 16
	Verwertung von Abfallstoffen zur Ethanol-Produktion mit Coimmobilisaten von Hefe und β -Galactosidase	19
	Calciumalginat als Modellsystem für die Immobilisierung von β -Galactosidase und deren Anwendung für die Lactose-Hydrolyse	24
Medizin und Pharmazie	Wundauflagen aus Calciumalginat-Fasern	25
	Dentalabdruckmassen auf Alginat-Basis	26, 27
	Alginat- und alginsäurehaltige Medikamente gegen Sodbrennen	28, 29
	Dekorporierung von radioaktivem Strontium	30
<u>Carrageenane</u> Lebensmittelindustrie	λ -Carrageenan als Stabilisator für Salatdressings mit Öl und Kräutern	43
	Nachweis von Carrageenan in Salatdressing, Tortenguss und Instant-Götterspeise	44
	Fruchtgummis auf Carrageenan-Basis	45
	pH-abhängige Reaktion von κ -Carrageenan mit Casein	46
	Vergleich der Gelstärken von Carrageenan-Gelen auf Wasser- und Milchbasis	47
	Stabilisierung von Kakaotränken mit κ -Carrageenan	48

^a Die Versuchsvorschriften finden jeweils sich im Experimentellen Teil.

In der Lebensmittelindustrie kommen Alginat und ihre organischen Derivate unter anderem als Verdickungsmittel und Stabilisatoren in Salatdressings zum Einsatz. Außerdem nutzt man sie als Formgeber für künstliche Lebensmittel, wie z. B. Paprikastreifen in gefüllten Oliven.

In der Biotechnologie finden die Polysaccharid-Derivate Verwendung als Trägermaterialien für die Immobilisierung von Mikroorganismen und Enzymen. So versucht man beispielsweise, in Calciumalginat-Gel immobilisierte Hefe-Zellen für die fermentative Ethanol-Gewinnung sowie für die Herstellung von Schaumweinen einzusetzen. Auch als Modell-

system für die Trägerfixierung und Anwendung immobilisierter β -Galactosidase sind Calciumalginat-Matrices geeignet.

Des Weiteren spielen Alginat eine wichtige Rolle auf dem medizinisch-pharmazeutischen Sektor: Zur Therapie von Wunden verwendet man z. B. Verbandstoffe aus Calciumalginat-Fasern, die den Heilprozess günstig beeinflussen. Ferner sind die Algenpolysaccharide funktionell wichtige Bestandteile von Dentalabdruckmassen und Arzneimitteln gegen Sodbrennen und werden für die Dekorporierung von radioaktivem Strontium eingesetzt.

Der Haupteinsatzbereich der Carrageenane liegt in der Lebensmittelindustrie. In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche präsentiert, die die Wirkung der Rotalgenpolysaccharide als Verdickungs- und Geliermittel sowie Stabilisatoren in Nahrungsmitteln auf Milch- und Wasserbasis veranschaulichen. Außerdem erfolgte die Entwicklung einer einfachen analytischen Methode, mit der sich die Salatdressings, Tortenguss und Instant-Götterspeise zugesetzten Carrageenane nach Durchführung weniger Aufbereitungsschritte nachweisen lassen.

Ein weiterer Schwerpunkt des Anwendungs-Teils dieser Arbeit bestand darin, experimentelle Studien zu potentiellen neuen Einsatzmöglichkeiten der beiden Algenpolysaccharide durchzuführen:

Für Alginat wurde ein Verfahren entwickelt, gemäß dem sich Alginsäure im Säulenbetrieb als Kationen-Austauscher für die quantitative Bestimmung von Calcium-, Strontium-, und Barium-Ionen einsetzen lässt. Die dabei erzielten Wiederfindungsraten sind so gut, dass ein Einsatz der Methode im Schul- und Hochschulbereich durchaus in Erwägung zu ziehen ist.

Zahlreiche Versuche zur säulenchromatographischen Trennung von Zucker-Gemischen mit Calciumalginat und Alginsäure sowie zur Saccharose-Hydrolyse und anschließenden Auftrennung der resultierenden Monosaccharid-Bausteine an Alginsäure-Säulen zeigten leider keine Erfolge. Dasselbe gilt für Experimente zur Racemat-Spaltung unter Einsatz von Alginsäure, Calciumalginat und κ -Carrageenan. In diesem Zusammenhang wurden allerdings Verfahren entwickelt für die Herstellung verschiedenartiger Algenpolysaccharid-Säulenfüllungen sowie deren Konditionierung für den Einsatz in wässrigen und organischen Medien, die zumindest als Ausgangspunkt für weiterführende Forschungsvorhaben zu potentiellen chemischen Anwendungen von Alginaten und Carrageenanen genutzt werden können.

Im letzten Kapitel des Theoretischen Teils wird aufgezeigt, dass die in der Arbeit diskutierten Inhalte durchaus von Relevanz für den schulischen Chemieunterricht sind, obwohl die Behandlung von Algenpolysacchariden curricular nicht explizit vorgesehen ist. Exemplarisch wurde hier deutlich gemacht, dass die Alginat- und Carrageenan-Chemie nicht nur für Lehrer und Schüler gleichermaßen neu und faszinierend ist, sondern zahlreiche Berührungspunkte zu zentralen fachwissenschaftlichen, interdisziplinären und anwendungs-

orientierten Themengebieten des Chemieunterrichtes aufweist. Dazu gehören insbesondere Kohlenhydrate, Struktur-Eigenschafts-Beziehungen von Makromolekülen, Anwendungen des Massenwirkungsgesetzes (Säure-Base- und Fällungsgleichgewichte), grenzflächenaktive Stoffe, Kolloide, Biochemie und -technologie sowie Lebensmittel und Medikamente.

Die meisten Experimente, die zu den Eigenschaften, der Gewinnung und den Einsatzmöglichkeiten der beiden Algenpolysaccharide entwickelt wurden, zeichnen sich zudem dadurch aus, dass sie auf Phänomene aus der Lebenswirklichkeit der Lernenden eingehen und größtenteils relativ einfach und gefahrlos in Form von Schülerversuchen durchführbar sind. Wie außerdem deutlich wurde, existieren für die vorgestellten Experimente verschiedenartige Einsatzmöglichkeiten im Hochschulbereich.

Wie die positive Resonanz auf eigene Veröffentlichungen, Vorträge, Lehrerfortbildungskurse und Schülerworkshops zu Alginaten und Carrageenanen belegt, haben die in dieser Arbeit dargelegten Inhalte inzwischen deutlich an chemiedidaktischer Bedeutung gewonnen.

D EXPERIMENTELLER TEIL

1 Allgemeine Hinweise

Die für die verwendeten Chemikalien und deren Zubereitungen angegebenen Gefahrensymbole, Gefahrenhinweise (R-Sätze) und Sicherheitsratschläge (S-Sätze) wurden den folgenden Datenbanken entnommen:

- GESTIS-Stoffdatenbank des Gefahrstoffinformationssystems der gewerblichen Berufsgenossenschaften (<http://www.hvbg.de/d/bia/fac/zesp/zesp.htm>),
- Merck Chemical Database Online (CD-ROM: 2002'1 Deutschland; Online-Version: <http://www.chemdat.de>),
- Datenbank mit Informationen über die Produkte der Firma Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>).

2 Versuchsvorschriften

2.1 Alginat

2.1.1 Chemischer Aufbau und Struktur

Experiment 1: Hydrolyse von Natriumalginat und Nachweis reduzierender Zucker mittels Fehling-Reaktion

Chemikalien

Natriumalginat (z. B. „Protanal LF 20/40“, Firma FMC BioPolymer), halbkonzentrierte Salzsäure (1 : 1) (**C**; R: 34-37; S: 25-45), Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat (**Xn, N**; R: 22-36/38-50/53; S: 22-60-61), Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat, Natriumhydroxid (**C**; R: 35; S: 26-37/39-45), Natriumhydrogencarbonat, Universalindikatorpapier (pH-Papier).

Anzusetzende Lösungen

- Fehlingsche Lösung 1:
7 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ werden mit entionisiertem Wasser zu $V = 100 \text{ mL}$ gelöst.
- Fehlingsche Lösung 2:
Man löst 34 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ und 10 g NaOH mit entionisiertem Wasser zu $V = 100 \text{ mL}$ (C; R: 25; S: 26-37/39-45).

Geräte

Becherglas (400 mL, niedrige Form), 2 Weithalslerlenmeyerkolben (50 mL), 2 Uhrgläser ($d = 4 \text{ cm}$), 2 Messkolben (100 mL), Vollpipette (10 mL), Peleusball, 5 Spritzen (2 x 1 mL; 2 x 2 mL; 1 x 10 mL; jeweils ohne Kanülen), 2 Reagenzgläser ($l = 16 \text{ cm}$, $d = 1,6 \text{ cm}$), Reagenzglasständer, 2 Glasstäbe, Magnetrührer mit Kontaktthermometer, 3 Rührfische (2 x 3 cm; 1 x 5 cm Länge), Spatel, Waage, Stativmaterial, Magnetstab zum Entfernen von Rührfischen.

Durchführung

Für die Hydrolyse des Polysaccharids wiegt man in einem 50-mL-Weithalslerlenmeyerkolben 0,3 g Natriumalginat ein und versetzt mit 10 mL halbkonzentrierter Salzsäure (Ausfällung von Alginsäure!). Der Kolben wird mit einem Uhrglas ($d = 4 \text{ cm}$) bedeckt und in einem vorher auf $\vartheta_{\text{konstant}} = 90 \text{ }^\circ\text{C}$ temperierten Wasserbad 20 Minuten unter Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 3 \text{ cm}$) erhitzt. Als Wasserbad verwendet man das mit entionisiertem Wasser gefüllte und mit einem Rührfisch ($l = 5 \text{ cm}$) versehene 400-mL-Becherglas.

Unter Rühren mit einem Glasstab wird das erhaltene Hydrolysat vorsichtig (starke Schaumbildung!) durch Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert.

Für die Überprüfung auf reduzierende Zucker vermischt man in einem Reagenzglas je 2 mL Fehlingscher Lösung 1 und 2 und fügt mit einer 1-mL-Spritze 1 mL des neutralisierten Hydrolysates hinzu. Bei Erhitzen dieses Reaktionsgemisches im Wasserbad ($\vartheta_{\text{konstant}} = 90 \text{ }^\circ\text{C}$) bildet sich nach etwa fünf Minuten ein deutlicher, dunkelroter Niederschlag von Cu_2O .

Zum Vergleich wird die Fehling-Reaktion mit einer nicht hydrolysierten Probe des Algenpolysaccharids durchgeführt: Dazu versetzt man in dem zweiten 50-mL-Weithalslerlenmeyerkolben 0,3 g Natriumalginat mit 10 mL halbkonzentrierter Salzsäure und neutralisiert die Mischung unter Rühren mit einem Glasstab unverzüglich durch portionsweise Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat.

Mit Hilfe einer Spritze (1 mL, ohne Kanüle) wird 1 mL der pH-neutralen Mischung entnommen und – wie oben beschrieben – auf reduzierende Zucker untersucht. Im Gegensatz zum Hydrolysat ist hier keine Cu_2O -Bildung zu beobachten.

2.1.2 Charakteristische Eigenschaften

Experiment 2: Herstellung eines Natriumalginat-Sols
--

Chemikalien

Natriumalginat („Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238), entionisiertes Wasser.

Geräte

Becherglas (250 mL, niedrige Form), Messzylinder (100 mL), Glasstab, heizbarer Magnet-
rührer, Rührfisch (l = 4 cm), Stabthermometer, Haushaltssieb (d = 7 cm), Waage, Spatel,
Magnetstab zum Entfernen von Rührfischen.

Durchführung

Für die Herstellung von 100 mL Natriumalginat-Lösung ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) werden in dem 250-
mL-Becherglas zunächst 90 mL entionisiertes Wasser unter Rühren mittels Magnet-
rührer und Rührfisch auf 70 °C erwärmt.

Nach Abstellen der Heizung wird die Rührgeschwindigkeit so stark erhöht, dass sich um
den Rührfisch ein Vortex bildet. Mit Hilfe des Haushaltssiebs siebt man nun portionsweise
2 g Natriumalginat auf die obere Vortexwand und rührt so lange weiter, bis sich das Al-
genpolysaccharid vollständig gelöst hat.

Die Beseitigung kleinerer Alginat-Klumpen, deren Bildung kaum vermeidbar ist, lässt sich
durch Einsatz eines Glasstabes beschleunigen.

Nachdem das homogenisierte Sol auf Raumtemperatur abgekühlt ist, entfernt man den
Rührfisch und den benutzten Glasstab (Abspülen!), füllt bis zur 50-mL-Marke mit entioni-
siertem Wasser auf und durchmischt nochmals mit einem sauberen Glasstab.

Die hergestellte Natriumalginat-Lösung kann für die Gelbildungsversuche weiterverwand
werden (vgl. Experimente 4 a) und b)).

Experiment 3: Faraday-Tyndall-Effekt bei Natriumalginat-Solen**Chemikalien**

Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) („Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), Natriumchlorid-Lösung ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$), D(+)-Glucose-Monohydrat-Lösung ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$), entionisiertes Wasser.

Geräte

4 Reagenzgläser ($l = 16 \text{ cm}$, $d = 1,6 \text{ cm}$), Reagenzglasständer, Taschenlampe.

Durchführung

Zur Demonstration des Faraday-Tyndall-Effekts füllt man vier Reagenzgläser jeweils bis zur Hälfte mit

- Natriumalginat-Sol,
- NaCl-Lösung,
- Glucose-Lösung,
- entionisiertem Wasser.

Die Lösungen werden in einem abgedunkelten Raum nacheinander mit dem Lichtstrahl einer Taschenlampe durchleuchtet (Umstellen von Lichtkegel auf gebündeltes Licht!). Der Faraday-Tyndall-Effekt tritt nur in der Probe mit dem Natriumalginat-Sol auf.

Experiment 4: Gelbildungseigenschaften von Alginaten**a) Gelbildung mit Calcium-Ionen****Chemikalien**

Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) („Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), CaCl_2 -Lösung ($w = 0,06$).

Geräte

2 Bechergläser (1 x 50 mL; 1 x 250 mL), Glasstab, Pinzette.

Durchführung

Das 50-mL-Becherglas wird zunächst mit 20 mL Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) und das 250-mL-Becherglas mit 150 mL CaCl_2 -Lösung ($w = 0,06$) gefüllt.

Unter leichtem Rühren mit einem Glasstab lässt man nun das Natriumalginat-Sol in möglichst gleichmäßigem Strahl in die CaCl_2 -Lösung einfließen.

Es fällt ein fadenförmiges Calciumalginat-Gel aus, das nach einer Aushärtezeit von etwa zwei Minuten mit Hilfe einer Pinzette aus dem Gelierbad entfernt werden kann.

b) Gelbildung mit Säure**Chemikalien**

Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) („Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), Salzsäure ($c = 1 \text{ mol/L}$).

Geräte

2 Bechergläser (1 x 50 mL; 1 x 250 mL), Glasstab, Pinzette.

Durchführung

Man füllt zunächst das 50-mL-Becherglas mit 20 mL Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) und das 250-mL-Becherglas mit 150 mL Salzsäure ($c = 1 \text{ mol/L}$).

Das Natriumalginat-Sol wird dann unter leichtem Rühren mit einem Glasstab in möglichst gleichmäßigem Strahl in die Salzsäure gegossen.

Es fällt ein weißes, fadenförmiges Alginsäure-Gel aus, das sich nach einer Gelierzeit von etwa zwei Minuten unter Einsatz einer Pinzette aus der Salzsäure entfernen lässt.

Experiment 5: Emulsionsstabilisierung durch Natriumalginat**Chemikalien**

Natriumalginat-Sole ($\rho^* = 5 \text{ g/L}$, 10 g/L und 20 g/L) („Protanal LF 20/40“, Firma FMC Bio-Polymer) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), Lösung von Sudanrot B⁹ in Speiseöl ($\rho^* = 0,5 \text{ g/L}$), entionisiertes Wasser.

Geräte

4 Reagenzgläser ($l = 16 \text{ cm}$, $d = 1,6 \text{ cm}$) mit Gummistopfen, Reagenzglasständer, Spritze (1 mL; ohne Kanüle).

Durchführung

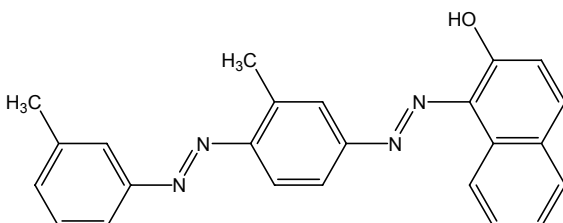
Um die emulsionsstabilisierende Wirkung der verschiedenen konzentrierten Natriumalginat-Sole zu untersuchen, füllt man vier Reagenzgläser bis zu einer Füllhöhe von 4 cm mit

- entionisiertem Wasser,
- Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 5 \text{ g/L}$),
- Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 10 \text{ g/L}$),
- Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$).

Nach Zugabe von je 1 mL Sudanrot-Lösung werden die Reagenzgläser mit Gummistopfen verschlossen, jeweils fünf Sekunden lang kräftig geschüttelt und zur Beobachtung in den Reagenzglasständer gestellt.

In der Probe mit entionisiertem Wasser ist schon nach etwa einer Minute eine Aufhellung im unteren Bereich der Emulsion erkennbar, und nach zehn Minuten haben sich die rot gefärbte Öl- und die Wasser-Phase bereits deutlich getrennt. In den alginathaltigen Ansätzen setzt die Phasenseparation hingegen verzögert ein. Man beobachtet, dass die Stabilität der Emulsionen mit steigender Massenkonzentration des Algenpolysaccharids zunimmt.

⁹ Bei Sudanrot B handelt es sich um folgenden Bisazofarbstoff:



Experiment 6: Suspensionsstabilisierung durch Natriumalginat**Chemikalien**

Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 10 \text{ g/L}$) („Protanal LF 20/40“, Firma FMC BioPolymer) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), Seesand für Chromatographiezwecke, entionisiertes Wasser.

Geräte

2 Reagenzgläser ($l = 16 \text{ cm}$, $d = 1,6 \text{ cm}$) mit Gummistopfen, Reagenzglasständer, Glasstrichter ($d = 3 \text{ cm}$), kleiner Spatel (Halbmikro-Maßstab), Waage.

Durchführung

Um die suspensionsstabilisierende Wirkung von Natriumalginat zu untersuchen, füllt man zwei Reagenzgläser bis zu einer Füllhöhe von 4 cm mit

- entionisiertem Wasser und
- Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 10 \text{ g/L}$).

Mit Hilfe eines Glasstrichters werden beide Proben mit je 100 mg (etwa zwei kleine Spatelspitzen eines Halbmikro-Spatels) Seesand versetzt, mit Gummistopfen verschlossen, viermal mäßig geschüttelt (ansonsten entstehen zu viele Luftblasen) und zur Beobachtung in das Reagenzglasgestell gestellt.

Während sich in dem Reagenzglas mit Wasser die Seesand-Partikel praktisch sofort absetzen, dauert es bei der mit Natriumalginat stabilisierten Suspension mehr als eine Minute, bis die Sedimentation erfolgt ist.

2.1.3 Gewinnung aus Braunalgen

Experiment 7: Gewinnung von Alginsäure aus Braunalgen
--

a) *Laminaria*-Spezies (Bretagne, Helgoland)

Chemikalien

Getrocknete *Laminaria*-Spezies (z. B. *Laminaria digitata* (Bretagne) oder *Laminaria hyperborea* (Helgoland)), konzentrierte Salzsäure ($w = 0,37$) (**C**; R: 34-37, S: 26-36/37/39-45), Natriumcarbonat (**Xi**; R: 36, S: 22-26), Calciumchlorid (**Xi**; R: 36, S: 22-24), Ethanol (96 Vol.-%) (**F**; R: 11, S: 7-16), Aceton (**F**; R: 11, S: 9-16-23.2-33), Ammoniumoxalat-Monohydrat (**Xn**; R: 21/22, S: 24/25), konzentrierte Ammoniak-Lösung ($w = 0,25$) (**Xi**; R: 34-37, S: 7-26-36/37/39-45), Universalindikatorpapier (pH-Papier), pH-Indikatorstäbchen (pH = 5 – 10), entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- Salzsäure ($c = 0,2$ mol/L),
- Na_2CO_3 -Lösung ($w = 0,005$),
- CaCl_2 -Lösung ($w = 0,1$),
- Ethanol (1 : 1),
- Ethanolische Salzsäure-Lösung ($c(\text{HCl}_{(\text{aq})}) = 0,5$ mol/L in Ethanol (1 : 1)),
- $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,04$).

Geräte

4 Bechergläser (2 x 100 mL; 2 x 2 L), 8 Saugflaschen (3 x 500 mL; 5 x 1 L; jeweils mit Gummimanschetten), Vakuumexsikkator, Petrischale ($d = 12$ cm), Reagenzgläser ($l = 16$ cm, $d = 1,6$ cm), Pasteur-Pipetten, 7 Glasstäbe, 4 Büchnertrichter (3 x 12 cm; 1 x 15 cm Durchmesser), 2 Magnetrührer (davon einer heizbar), Kontaktthermometer, 4 Rührfische (2 x 3 cm; 2 x 5 cm Länge), elektrische Kaffeemühle, Waage, Membranpumpe (komplett mit Woulfescher Flasche, Kühlfalle und Dewar), Reagenzglasständer, 2 Löffelspatel, 2 Gummiwischer, 3 mittelweitporige Rundfilter ($d = 11$ cm), Filtriergewebe (feiner Nesselstoff), Stativmaterial, Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen, Spatel, Waage.

Durchführung

In einer elektrischen Kaffeemühle werden etwa 7 g getrocknete Braunalgen möglichst fein gemahlen. Exakt 5 g der pulverisierten Algen versetzt man in einem Becherglas (100 mL) mit 50 mL Salzsäure ($c = 0,2 \text{ mol/L}$). Die Mischung wird 30 Minuten mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 3 \text{ cm}$) gerührt und danach über einen mit mittelweitporigem Filterpapier ausgelegten Büchnertrichter ($d = 12 \text{ cm}$) in eine Saugflasche (500 mL) abgesaugt. Dabei ist darauf zu achten, dass im Becherglas verbleibende Mischungsreste durch Einsatz eines Gummischwamms sowie durch Nachspülen mit 50 mL Salzsäure ($c = 0,2 \text{ mol/L}$) möglichst vollständig in den Trichter überführt werden.

Der Filtrierrückstand aus dem Büchnertrichter wird nochmals der im Vorangehenden beschriebenen dreißigminütigen Behandlung mit Salzsäure ($c = 0,2 \text{ mol/L}$) unterzogen. Zum Absaugen der Algen-Salzsäure-Mischung ist ein neuer mittelweitporiger Rundfilter zu verwenden.

Den als Filtrierrückstand erhaltenen Feststoff gibt man in ein Becherglas (2 L) mit 150 mL Natriumcarbonat-Lösung, die zuvor mittels Magnetrührer und Kontaktthermometer auf $\vartheta = 45 \text{ °C}$ erwärmt wurde. Die Mischung wird unter Rühren mit einem Rührfisch ($l = 5 \text{ cm}$) 15 Minuten auf dieser Temperatur gehalten.

Nach Abschalten der Heizung des Magnetrührers sowie Entfernung des Kontaktthermometers und des Rührfisches füllt man mit entionisiertem Wasser bis zur 1-L-Marke des Becherglases auf und durchmischt gründlich mit einem Glasstab.

Die verdünnte Extraktionsmischung wird anschließend über einen mit einem passenden Stück Filtriergewebe ausgelegten Büchnertrichter ($d = 15 \text{ cm}$) in eine Saugflasche (1 L) abgesaugt. Da der feine Nesselstoff aufgrund der hohen Viskosität der Mischung sehr leicht verstopft, muss die Filtration portionsweise vorgenommen werden. Dabei hat es sich als günstig erwiesen, nacheinander drei etwa gleich große Mischungspartien abzusaugen und zwischendurch das Filtriergewebe zu wechseln.

Das in der Saugflasche (1 L) aufgefangene Filtrat der Extraktionsmischung bringt man in Form eines dünnen Strahls in ein Becherglas (2 L) mit 100 mL Calciumchlorid-Lösung ($w = 0,1$) ein. Dabei wird das Gelierbad mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 5 \text{ cm}$) mit mittlerer Geschwindigkeit gerührt.

Nach einer Rührzeit von 20 Minuten wird das ausgefallene Calciumalginat-Gel vom Fällungsbad durch Absaugen über einen mit Nesselstoff ausgelegten Büchnertrichter ($d = 12 \text{ cm}$) in eine Saugflasche (1 L) abgetrennt. Diese Operation lässt sich durch zusätzliches Ausdrücken der Gelmasse mit zwei Löffelspateln besonders effektiv gestalten.

Das im Büchnertrichter verbliebene feste Calciumalginat wird in einen mit mittelweitporigem Filterpapier ausgelegten Büchnertrichter ($d = 12 \text{ cm}$) überführt und durch Waschen mit ethanolischer Salzsäure ($c(\text{HCl}_{(\text{aq})}) = 0,5 \text{ mol/L}$ in Ethanol (1 : 1)) in Alginsäure umge-

wandelt. Die Säurebehandlung muss so lange erfolgen, bis im mit konzentrierter Ammoniak-Lösung ($w = 0,25$) abgestumpften Filtrat mit $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,04$) keine Calcium-Ionen mehr nachweisbar sind. Dafür empfiehlt sich folgende Vorgehensweise: Man setzt den das Calciumalginat enthaltenden Büchnertrichter zunächst auf eine Saugflasche (1 L) auf und versetzt das Gel unter Absaugen mit der Membranpumpe zehnmal mit je einer 100-mL-Portion ethanolischer Salzsäure. Die relativ kompakte Gelmasse wird dabei mit zwei Glasstäben zerfasert. Für das Waschen mit weiteren 100 mL ethanolischer Salzsäure wird eine separate Saugflasche (500 mL) verwendet. Dem dabei erhaltenen Filtrat entnimmt man eine 1-mL-Probe, gibt diese in ein Reagenzglas, stumpft durch Zufügen weniger Tropfen konzentrierter Ammoniak-Lösung ($w = 0,25$) unter Prüfung mit Universalindikatorpapier auf $\text{pH} \approx 6 - 8$ ab und versetzt mit 1 mL $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,04$). Wenn das Filtrat Ca^{2+} -frei ist, darf hier keine durch Ausfallen von Calciumoxalat verursachte weiße Trübung zu beobachten sein. Sollte das jedoch der Fall sein, muss die Behandlung mit ethanolischer Salzsäure fortgesetzt werden.

Die bis zur Ca^{2+} -Freiheit gewaschene Alginsäure wird daraufhin von der anhaftenden überschüssigen Salzsäure befreit. Dazu behandelt man den Feststoff unter Absaugen mit der Membranpumpe sukzessive mit zehn 100-mL-Portionen Ethanol (1 : 1). Durch Zuhilfenahme von zwei Glasstäben wird für eine gute Zerfaserung der Alginsäure gesorgt. Das Waschen mit einer weiteren 100-mL-Portion Ethanol (1 : 1) erfolgt unter Verwendung einer separaten Saugflasche (500 mL). Dem darin aufgefangenen Filtrat entnimmt man eine Probe und prüft deren pH-Wert mit Indikatorstäbchen: Dieser sollte bei $\text{pH} = 5 - 5,5$ liegen; ansonsten ist die Alginsäure erneut mit Ethanol (1 : 1) zu waschen.

Der Büchnertrichter mit der von überschüssiger Salzsäure befreiten Alginsäure wird anschließend auf eine saubere Saugflasche (1 L) aufgesetzt. Durch Behandlung mit je zwei 100-mL-Portionen Ethanol (96 Vol.-%) sowie Aceton wird die noch stark wasserhaltige Alginsäure unter Absaugen mit der Membranpumpe partiell dehydratisiert. Mit Hilfe von zwei Glasstäben sorgt man auch hier wieder für eine Zerfaserung des Feststoffes.

Die auf diese Weise behandelte Alginsäure überführt man aus dem Büchnertrichter in das vorher ausgewogene Unterteil einer Petrischale ($d = 12 \text{ cm}$) und wägt erneut. In einem Vakuumexsikkator wird das Algenpolysaccharid-Derivat so lange bei eingeschalteter Membranpumpe getrocknet, bis sich Massenkonstanz eingestellt hat. Die trockene Alginsäure lässt sich in der elektrischen Kaffeemühle mahlen.

b) *Fucus vesiculosus* (Nordsee)**Chemikalien**

Getrockneter Blasentang (z. B. *Fucus vesiculosus* (Nordsee)), konzentrierte Salzsäure ($w = 0,37$) (C; R: 34-37, S: 26-36/37/39-45), Natriumcarbonat (Xi; R: 36, S: 22-26), Cellulose-Ionenaustauscher („DEAE 23 SH“, Firma Serva), Calciumchlorid (Xi; R: 36, S: 22-24), Ethanol (96 Vol.-%) (F; R: 11, S: 7-16), Aceton (F; R: 11, S: 9-16-23.2-33), Ammoniumoxalat-Monohydrat (Xn; R: 21/22, S: 24/25), konzentrierte Ammoniak-Lösung ($w = 0,25$) (Xi; R: 34-37, S: 7-26-36/37/39-45), Universalindikatorpapier (pH-Papier), pH-Indikatorstäbchen (pH = 5 – 10), entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- Salzsäure ($c = 0,2 \text{ mol/L}$),
- Na_2CO_3 -Lösung ($w = 0,005$),
- CaCl_2 -Lösung ($w = 0,1$),
- Ethanol (1 : 1),
- Ethanolische Salzsäure-Lösung ($c(\text{HCl}_{(\text{aq})}) = 0,5 \text{ mol/L}$ in Ethanol (1 : 1)),
- $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,04$).

Geräte

5 Bechergläser (2 x 100 mL; 3 x 1 L), 8 Saugflaschen (3 x 500 mL; 5 x 1 L; jeweils mit Gummimanschetten), Vakuumexsikkator, Petrischale ($d = 12 \text{ cm}$), Reagenzgläser ($l = 16 \text{ cm}$, $d = 1,6 \text{ cm}$), Pasteur-Pipetten, 8 Glasstäbe, 4 Büchnertrichter (3 x 12 cm; 1 x 15 cm Durchmesser), heizbarer Magnetrührer mit Kontaktthermometer, 6 Rührfische (2 x 3 cm; 4 x 5 cm Länge), elektrische Kaffeemühle, Waage, Membranpumpe (komplett mit Woulfescher Flasche, Kühlfalle und Dewar), Reagenzglasständer, 2 Löffelspatel, 2 Gummimischer, 5 mittelweitporige Rundfilter ($d = 11 \text{ cm}$), Filtriergewebe (feiner Nesselstoff), Stativmaterial, Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen, Spatel, Waage.

Durchführung

Die Anfangsschritte der Gewinnung von Alginsäure aus *Fucus vesiculosus* entsprechen den in Versuchsteil a) beschriebenen:

Zunächst werden 5 g gemahlener Blasentang zweimal sukzessive mit 50 mL Salzsäure ($c = 0,2 \text{ mol/L}$) behandelt. Nach Abfiltrieren über einen mittelweitporigen Filter, schließt man die als festen Rückstand erhaltene Algenmasse in einem 1-L-Becherglas bei einer Temperatur von $\vartheta = 45 \text{ °C}$ mit 150 mL Natriumcarbonat-Lösung auf.

Das resultierende Natriumalginat-Sol wird nun nur auf ein Volumen von 300 mL mit entionisiertem Wasser aufgefüllt und gemäß der Arbeitsvorschrift in Experiment 7 a) filtriert. An der Becherglaswand anhaftende Rückstände der viskosen Algenpolysaccharid-Lösung löst man durch Spülen mit weiteren 100 mL Wasser und vereinigt sie nach Filtration mit der Hauptmenge des Sols. Das Gesamtvolumen des auf diese Weise erhaltenen Filtrates beträgt somit etwa 400 mL. Eine größere Verdünnung der Natriumalginat-Lösung sollte vermieden werden, da ansonsten die Ausfällung von Calciumalginat-Gel nicht mehr gut funktioniert.

Das Filtrat der Extraktionsmischung wird im nächsten Arbeitsschritt einer Behandlung mit Cellulose-Ionenonenaustauscher unterzogen. Dazu rührt man das verfärbte Natriumalginat-Sol in einem 1-L-Becherglas mit 3 g Adsorbens 15 Minuten mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 5 \text{ cm}$). Nach Abfiltrieren der Mischung über einen Büchnertrichter ($d = 15 \text{ cm}$) mit mittelweitporigem Filterpapier wird das erhaltene Filtrat erneut auf die oben beschriebene Weise mit Cellulose-Ionenaustauscher gereinigt.

Das teilweise entfärbte Natriumalginat-Sol lässt man nun mit gleichmäßigem Strahl in ein 1-L-Becherglas mit 400 mL Calciumchlorid-Lösung ($w = 0,1$). Zur Durchmischung wird gründlich mit einem Glasstab gerührt.

Die Abtrennung und Aufarbeitung des ausgefällten Calciumalginat-Gels mit ethanolischer Salzsäure bleibt unverändert.

Zur Dehydratisierung und weiteren Entfärbung der wasserhaltigen Alginsäure werden – abweichend von Experiment 7 a) – 300 mL Ethanol eingesetzt.

Experiment 8: Bestimmung des Reinheitsgrades von Alginsäure

a) *Laminaria*-Spezies

Chemikalien

Getrocknete Alginsäure, Ampulle mit Salzsäure zur Herstellung von 1 L Maßlösung ($c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/L}$), Natriumhydroxid (**C**; R: 35, S: 26-37/39-45), Phenolphthalein, Ethanol (96 Vol.-%) (**F**; R: 11, S: 7-16), entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- Salzsäure-Maßlösung ($c = 0,1 \text{ mol/L}$, $t = 1,00$),
- Verdünnte Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$, t ist zu bestimmen),
- Phenolphthalein-Lösung ($w = 0,001$ in Ethanol ($w = 0,7$)).

Geräte

Bürette (50 mL), 4 Weithals-erlenmeyerkolben (50 mL), 2 Vollpipetten (1 x 10 mL; 1 x 25 mL), 2 Magnetrührer (davon einer heizbar), 4 Rührfische ($l = 3 \text{ cm}$), elektrische Kaffeemühle, Waage, Stativmaterial, weißes Papier.

Durchführung

Zur Bestimmung des Titors der verdünnten Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) legt man 10 mL dieser Lösung in einem Weithals-erlenmeyerkolben (50 mL) vor, füllt mit entionisiertem Wasser bis zur 25-mL-Marke auf und titriert nach Zufügen von vier Tropfen Phenolphthaleinlösung ($w = 0,001$ in Ethanol ($w = 0,7$)) mit verdünnter Salzsäure ($c = 0,1 \text{ mol/L}$, $t = 1,00$) unter Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 3 \text{ cm}$) bis zum Farbumschlag von rotviolett nach farblos. Um den Umschlagspunkt gut sichtbar zu machen, empfiehlt es sich, die Oberfläche des Rührers mit einem weißen Papier zu bedecken. Die Titration wird mit einer zweiten 10-mL-Probe der Natronlauge wiederholt.

Zur Ermittlung des Reinheitsgrades der in Experiment 7 gewonnenen Alginsäure verfährt man folgendermaßen:

Zunächst werden etwa 0,5 g der bis zur Massenkonstanz getrockneten Substanz in einer elektrischen Kaffeemühle gemahlen. In einem Weithals-erlenmeyerkolben (50 mL) versetzt man exakt 200 mg der zerkleinerten Alginsäure mit 25 mL der Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) mit bekanntem Titer. Unter Rühren mittels Rührfisch ($l = 3 \text{ cm}$) wird die Mischung bei einer Temperatureinstellung von etwa $50 \text{ }^\circ\text{C}$ so lange auf der Heizplatte des Magnetrührers erwärmt, bis sich die Alginsäure durch Reaktion mit Natronlauge vollständig zu Natriumalginat umgesetzt hat. Dies ist dann gegeben, wenn in dem entstehenden viskosen Sol keine festen Alginsäure-Partikel mehr erkennbar sind.

Nachdem das Sol auf Raumtemperatur abgekühlt ist, platziert man den Weithals-erlenmeyerkolben auf der mit weißem Papier bedeckten Platte des für die Titerbestimmung verwendeten Magnetrührers. Die im Kolben vorliegende überschüssige Natronlauge wird nun nach Zufügen von vier Tropfen Phenolphthalein-Lösung unter Rühren mit verdünnter Salzsäure ($c = 0,1 \text{ mol/L}$, $t = 1,00$) zurücktitriert (Farbumschlag von rot-violett nach farblos). Der Reinheitsgrad einer zweiten 200-mg-Probe der extrahierten Alginsäure wird auf analoge Weise bestimmt.

Ergebnisse

Vgl. Kapitel 2.4.3.1 des Theoretischen Teils.

b) *Fucus vesiculosus***Chemikalien und anzusetzende Lösungen**

Siehe Versuchsteil a).

Geräte

Bürette (50 mL), 4 Weithals-erlenmeyerkolben (50 mL), 3 Vollpipetten (10 mL), 2 Magnet-rührer (davon einer heizbar), 4 Rührfische ($l = 3 \text{ cm}$), elektrische Kaffeemühle, Waage, Stativmaterial, weißes Papier.

Durchführung

Gemäß der in Versuchsteil a) angegebenen Vorschrift wird zunächst der Titer der Natron-lauge ($c \approx 0,1 \text{ mol/L}$) bestimmt.

Anschließend ermittelt man den Säuregehalt der aus *Fucus vesiculosus* gewonnenen Al-ginsäure nach dem dort beschriebenen Prinzip. Da die Ausbeute an Algenpolysaccha-rid allerdings sehr gering ist, werden nur 100,00 mg der extrahierten Alginsäure in einen Weithals-erlenmeyerkolben (50 mL) eingewogen und in der Wärme mit 10 mL Natronlauge umgesetzt.

Die Titration der abgekühlten Lösung erfolgt in Analogie zu Experiment 8 a). Allerdings werden 10 Tropfen Phenolphthalein-Lösung zugesetzt, damit ein deutlicher Farbumschlag erkennbar ist.

Die Bestimmung des Reinheitsgrades wird mit einer zweiten Alginsäure-Probe wiederholt.

Ergebnisse

Vgl. Kapitel 2.4.3.2 des Theoretischen Teils.

Experiment 9: Vereinfachte Isolierung von Rohalginat aus Braunalgen**a) *Undaria pinnatifida* (Asia-Laden)****Chemikalien**

Getrocknete Braunalgen (*Undaria pinnatifida*; erhältlich in Asia-Läden unter der Bezeichnung „Ito-Wakame“), Salzsäure ($c = 0,2 \text{ mol/L}$), Na_2CO_3 -Lösung ($w = 0,005$), CaCl_2 -Lösung ($c = 1 \text{ mol/L}$), Salzsäure ($c = 1 \text{ mol/L}$), entionisiertes Wasser.

Geräte

5 Bechergläser (1 x 50 mL; 2 x 100 mL; 1 x 250 mL, niedrige Form; 1 x 800 mL, niedrige Form), Erlenmeyerkolben (100 mL), Messzylinder (25 mL), Messzylinder (250 mL), Uhrglas ($d = 10 \text{ cm}$), Unterteil einer Petrischale ($d = 14 \text{ cm}$), Schnelllauftrichter ($d = 11 \text{ cm}$), Faltenfilter ($d = 24 \text{ cm}$), Magnetrührer (heizbar), 2 Rührfische (1 x 2 cm; 1 x 4 cm), elektrische Kaffeemühle, Mehrweg-Kaffeefilter aus Edeldahlgewebe, Löffelspatel, Gummiwischer, Stativmaterial, Waage.

Durchführung

1,5 g der in der Kaffeemühle pulverisierten Algen werden in dem 50-mL-Becherglas eingewogen und mit 25 mL Salzsäure ($c = 0,2 \text{ mol/L}$) versetzt. Die Mischung wird zehn Minuten mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 2 \text{ cm}$) gerührt und danach mit Hilfe des Schnelllauftrichters durch einen Faltenfilter in den Erlenmeyerkolben abfiltriert (Flüssigkeitssäule!). Im Becherglas verbleibende Mischungsreste lassen sich durch Nachspülen mit etwas Salzsäure ($c = 0,2 \text{ mol/L}$) und Einsatz eines Gummiwischers nahezu vollständig in den Filter überführen.

Den als Filtrierrückstand erhaltenen Feststoff bringt man mit Hilfe des Gummiwischers in das 250-mL-Becherglas. Ein unter den Faltenfilter gelegtes, umgedrehtes Petrischalenteil erleichtert diesen Arbeitsschritt merklich.

Nach Versetzen mit 150 mL Natriumcarbonat-Lösung ($w = 0,005$) und Abdecken des Becherglases mit einem Uhrglas wird die darin befindliche Mischung unter Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) bei maximaler Temperatureinstellung zum Sieden erhitzt. Da die Viskosität des Becherglasinhaltes beim Erwärmen steigt, muss die Rührgeschwindigkeit im Laufe dieses Vorganges erhöht werden.

Die siedende Mischung wird so schnell wie möglich mit Hilfe des Mehrweg-Kaffeefilters in das 800-mL-Becherglas abfiltriert. Als Schutz vor Verbrennungen wird das heiße Becherglas dabei mit einem Handtuch oder Ähnlichem umfasst.

Um den Filtriervorgang zu beschleunigen, neigt man den Filter zur Erzeugung einer Flüssigkeitssäule leicht zur Seite und streicht die Mischung unter Einsatz eines Löffelspatels durch das Edeltahlgewebe.

Mit dem erhaltenen Filtrat werden anschließend folgende Geliertests durchgeführt: Zunächst wird ein 100-mL-Becherglas mit 40 mL CaCl_2 -Lösung ($c = 1 \text{ mol/L}$) und ein zweites mit dem gleichen Volumen verdünnter Salzsäure ($c = 1 \text{ mol/L}$) gefüllt. In jedes der Bechergläser lässt man nun in gleichmäßigem Strahl einige mL des Filtrats einfließen. Es bilden sich fadenförmige Calciumalginat- und Alginsäure-Gele, die aufgrund ihrer noch relativ starken Verunreinigung mit Farbstoffen eine grünbraune Farbe aufweisen. Das Alginsäure-Gel ist verhältnismäßig labil, da es mit CO_2 -Gasblasen durchsetzt ist, die bei der Reaktion von überschüssigem Na_2CO_3 mit Salzsäure entstehen.

b) *Fucus vesiculosus* (Nordsee)

Chemikalien

Getrocknete Braunalgen (*Fucus vesiculosus* (Nordsee)), Salzsäure ($c = 0,2 \text{ mol/L}$), Na_2CO_3 -Lösung ($w = 0,005$), CaCl_2 -Lösung ($c = 1 \text{ mol/L}$), Salzsäure ($c = 1 \text{ mol/L}$), entionisiertes Wasser.

Geräte

5 Bechergläser (1 x 50 mL; 2 x 250 mL, niedrige Form; 1 x 600 mL, hohe Form; 1 x 1 L, niedrige Form), Erlenmeyerkolben (100 mL), Messzylinder (25 mL), Messzylinder (250 mL), Uhrglas ($d = 10 \text{ cm}$), Unterteil einer Petrischale ($d = 14 \text{ cm}$), Schnelllauftrichter ($d = 11 \text{ cm}$), Faltenfilter ($d = 24 \text{ cm}$), Magnetrührer (heizbar), 2 Rührfische (1 x 2 cm; 1 x 4 cm), elektrische Kaffeemühle, Mehrweg-Kaffeefilter aus Edeltahlgewebe, Löffelspatel, 2 Glasstäbe, Gummiwischer, Stativmaterial, Waage.

Durchführung

In der Kaffeemühle werden 8 – 9 g *Fucus vesiculosus* möglichst fein gemahlen. In dem 50-mL-Becherglas versetzt man 7,5 g der pulverisierten Algen mit 25 mL Salzsäure ($c = 0,2 \text{ mol/L}$). Die Mischung wird zehn Minuten mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 2 \text{ cm}$) gerührt und danach mit Hilfe des Schnelllauftrichters durch einen Faltenfilter in den Erlenmeyerkolben abfiltriert (Flüssigkeitssäule!). Im Becherglas verbleibende Mischungsreste lassen sich durch Nachspülen mit etwas Salzsäure ($c = 0,2 \text{ mol/L}$) und Einsatz des Gummiwischers nahezu vollständig in den Filter überführen.

Den als Filtrierrückstand erhaltenen Feststoff bringt man mit Hilfe des Gummiwischers in das 600-mL-Becherglas. Ein unter den Faltenfilter gelegtes, umgedrehtes Petrischalenunterteil erleichtert diesen Arbeitsschritt merklich.

Nach Versetzen mit 150 mL Natriumcarbonat-Lösung ($w = 0,005$) und Abdecken des Becherglases mit einem Uhrglas wird die darin befindliche Mischung unter Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) bis fast zum Sieden erhitzt. Die Heizung des Magnetrührers sollte dabei auf eine Temperatur von etwa $200 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt werden. Kurz vor Siedebeginn setzt eine Gasentwicklung ein und die Mischung beginnt sehr stark zu schäumen.

Bei abgestellter Heizung wird der Inhalt des 600-mL-Becherglases anschließend nochmals zehn Minuten gerührt. Sollte während dieser Zeit die Schaumbildung so stark sein, dass die Mischung droht, über den Gefäßrand zu treten, empfiehlt es sich, das Uhrglas kurzzeitig abzunehmen.

Danach verdünnt man die Mischung mit entionisiertem Wasser auf ein Volumen von 200 mL (Auffüllen bis zur Marke des Becherglases) und erhitzt nach Abdecken mit einem Uhrglas bei voller Heizleistung bis zum Sieden. Durch die Temperaturerhöhung verringert sich die Viskosität der Mischung, und sie lässt sich dann viel leichter mit Hilfe eines Mehrweg-Kaffeefilters in das 1-L-Becherglas abfiltrieren.

Mit dem erhaltenen Filtrat führt man folgende Geliertests durch: Zunächst werden zwei 250-mL-Bechergläser mit je 150 mL CaCl_2 -Lösung ($c = 1 \text{ mol/L}$) bzw. verdünnter Salzsäure ($c = 1 \text{ mol/L}$) gefüllt. In jedes der Bechergläser lässt man anschließend unter Rühren mit einem Glasstab in gleichmäßigem Strahl etwa 20 mL des Filtrats einfließen. Das sich bildende fadenförmige Calciumalginat-Gel und das eher faserig ausfallende Alginsäure-Gel sind noch stark mit Farbstoffen verunreinigt.

2.1.4 Ausgewählte Anwendungsmöglichkeiten

2.1.4.1 Lebensmittelindustrie

Experiment 10: Alginat als Stabilisator für Salatdressings

Chemikalien

Natriumalginat-Lösung ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) („Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), gefriergetrocknete Salatkräuter („Kräutaan“, Firma Lidl), Speiseöl, entionisiertes Wasser.

Geräte

2 Reagenzgläser ($l = 16 \text{ cm}$, $d = 1,6 \text{ cm}$) mit Gummistopfen, Reagenzglasständer, Spritze (1 mL; ohne Kanüle), Magnetrührer und Rührfisch.

Durchführung

Die gefriergetrockneten Salatkräuter müssen zunächst in einer Öl-Wasser-Mischung quellen, bevor sie für den eigentlichen Versuch verwandt werden können. Zu diesem Zweck wiegt man 3 g der im Mörser leicht zerkleinerten Kräuter in einem Weithalslerlenmeyerkolben (50 mL) ein, versetzt mit 25 mL Salatöl und dem gleichen Volumen entionisierten Wassers und rührt etwa 1 ½ Stunden mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 3 \text{ cm}$).

Um die emulsions- und suspensionsstabilisierende Wirkung von Natriumalginat zu demonstrieren, werden zwei Reagenzgläser bis zu einer Füllhöhe von 4 cm mit entionisiertem Wasser bzw. Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) gefüllt. Mit der Spritze entnimmt man der Salatkräuter-Öl-Wasser-Mischung zwei 1-mL-Portionen und gibt sie in die vorbereiteten Reagenzgläser. Die Mischung muss während der Entnahme weiter mit dem Magnetrührer gerührt werden, da ansonsten eine Phasentrennung erfolgt. Die mit Salatkräuter-Öl-Wasser-Mischung versehenen Reagenzgläser werden mit Stopfen verschlossen, zehn Sekunden kräftig geschüttelt und zur Beobachtung in den Reagenzglasständer gestellt.

In dem Ansatz mit entionisiertem Wasser ist das Einsetzen der Phasentrennung bereits nach ca. 30 – 60 Sekunden gut erkennbar. Nach etwa fünf Minuten hat sich die Öl-Phase, die einen Großteil der suspendierten Kräuter enthält, sehr deutlich von der Wasser-Phase abgesetzt. Die grünliche Farbe der Wasser-Phase wird durch das aus den zermörserten Kräutern freigesetzte Chlorophyll verursacht.

In dem mit Natriumalginat stabilisierten Salatdressing ist hingegen auch nach 20 – 30 Minuten noch keine Entmischung zu beobachten. In Abhängigkeit von den Eigenschaften des eingesetzten Algenpolysaccharids und der Größe der suspendierten Kräuter-Partikel sind die Dressings sogar noch längere Zeit stabil.

Experiment 11: Herstellung restrukturierter Paprikastreifen

Chemikalien

Rote Paprikaschoten, Natriumalginat („Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238) Guarkernmehl („Guaran“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Aldrich 28,599-4), Calciumchlorid-Dihydrat (**Xi**; R: 36, S: 22-24), Natriumchlorid, Milchsäure ($w \approx 0,90$) (**Xi**; R: 36/38), entionisiertes Wasser, Eis.

Anzusetzende Lösungen

- Polysaccharid-Sol (ρ^* (Natriumalginat) = 19 g/L; ρ^* (Guarkernmehl) = 9,5 g/L) (zur Herstellung vgl. Versuchsdurchführung),
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,1$),
- Wässrige Lösung von Calciumchlorid-Dihydrat ($w = 0,03$), Natriumchlorid ($w = 0,08$) und Milchsäure ($w = 0,008$).

Geräte

Bechergläser (1 x 100 mL; 1 x 250 mL, niedrige Form; 1 x 400 mL; 2 x 600 mL, hohe Form), Kristallisierschale ($d = 14 \text{ cm}$), Messzylinder (1 x 25 mL; 1 x 100 mL; 1 x 250 mL), heizbarer Magnetrührer, Rührfisch ($l = 5 \text{ cm}$), 3 Glasstäbe, Gummiwischer, Polyethylenflasche (250 mL), Haushaltsmischer, Haushaltssiebe (1 x 7 cm, 1 x 8 cm Durchmesser), Blumensprüher, Haushaltsmesser, schnittfeste Unterlage, Stabthermometer, Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen, Parafilm, Spatel, Waage.

Durchführung

Vor Versuchsbeginn ist zunächst ein Paprika-Konzentrat herzustellen: Dafür werden zwei rote Paprikaschoten gewaschen, gesäubert, in Würfel geschnitten und im Haushaltsmischer püriert. Das Paprika-Püree überführt man anschließend in ein Becherglas (600 mL, hohe Form) und erhitzt es unter Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 5 \text{ cm}$) zum Sieden. Um die groben Reste der Paprikaschoten abzutrennen, wird das Püree noch heiß

durch ein kleines, feinmaschiges Haushaltssieb ($d = 8 \text{ cm}$) in ein Becherglas (600 mL, hohe Form) abfiltriert. Das dabei erhaltene tiefrote, getrübe Filtrat füllt man in eine Polyethylenflasche ab und bewahrt es bis zur Verwendung im Kühlschrank auf.

Des Weiteren muss für die Restrukturierungsmasse ein Polysaccharid-Sol (ρ^* (Natriumalginat) = 19 g/L; ρ^* (Guarkernmehl) = 9,5 g/L) vorbereitet werden: Dafür erwärmt man in einem Becherglas (250 mL, niedrige Form) mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 5 \text{ cm}$) etwa 80 mL entionisiertes Wasser auf $70 \text{ }^\circ\text{C}$ (Temperaturkontrolle mit Stabthermometer). In der Zwischenzeit werden in einem Mörser ($d = 5,5 \text{ cm}$) 1,9 g Natriumalginat und 0,95 g Guarkernmehl eingewogen und mit Hilfe des Pistills gründlich verrieben. Sobald die gewünschte Temperatur erreicht ist, schaltet man die Heizung des Magnetrührers aus und siebt unter Zuhilfenahme eines Haushaltssiebs ($d = 7 \text{ cm}$) das Polysaccharid-Gemisch portionsweise in das erwärmte entionisierte Wasser ein. Das entstehende hochviskose Sol muss so lange intensiv gerührt werden, bis sich Natriumalginat und Guarkernmehl vollständig gelöst haben. Die Beseitigung entstehender Klumpen lässt sich durch kräftiges Rühren des Sols mit einem Glasstab beschleunigen.

Aus dem auf Raumtemperatur abgekühlten Sol entfernt man den Rührfisch und den Glasstab unter gründlichem Abspülen der anhaftenden Solreste und füllt mit entionisiertem Wasser bis zur 100-mL-Marke des Becherglases auf. Das Sol wird abschließend nochmals mit einem Glasstab durchgerührt.

Für die Herstellung restrukturierter Paprikastreifen geht man dann folgendermaßen vor: Zunächst wird ein 100-mL-Becherglas mit 40 mL Polysaccharid-Sol gefüllt. Nach Zufügen von 10 mL Paprika-Konzentrat vermischt man die beiden Komponenten sorgfältig mit einem Glasstab. Die erhaltene Mischung wird unter Verwendung eines Gummiwischers möglichst vollständig in die Kristallisierschale ($d = 14 \text{ cm}$) überführt und so verteilt, dass der gesamte Boden mit einer dünnen Schicht bedeckt ist.

Mit Hilfe des Blumensprühers versieht man die in der Kristallisierschale ausgestrichene Polysaccharid-Paprika-Mischung mit einem gleichmäßigen Film aus Calciumchlorid-Dihydrat-Lösung ($w = 0,1$). Die nach kurzer Zeit zu beobachtende Kontraktion der Restrukturierungsmasse zeigt den Beginn der Gelbildung an. Nach einer zehnminütigen Einwirkzeit wird das partiell ausgehärtete Paprika-Calciumalginat-Gel vorsichtig mit weiteren 100 mL der $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,1$) übergossen und verbleibt bis zur vollständigen Aushärtung noch 30 – 35 Minuten in diesem Gelierbad.

Das resultierende Paprika-Calciumalginat-Gel schneidet man auf einer Unterlage in etwa $0,5 - 0,6 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$ große Streifen.

Die restrukturierten Paprikastreifen sind noch zu spröde, um für die Füllung von Oliven verwandt werden zu können. Sie werden daher im Rahmen des industriellen Herstellungsprozesses noch mehrere Tage in einem Reifebad aufbewahrt, das NaCl ($w = 0,08$) und $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ($w = 0,03$) sowie Milchsäure ($w = 0,008$) als Säuerungsmittel enthält.

Hier erfolgt aufgrund des hohen Überschusses an Na^+ - gegenüber Ca^{2+} -Ionen eine partielle Wiederauflösung des Gels unter Rückbildung des Sols, wodurch die Elastizität der Paprikastreifen erhöht wird.

Wenn dieser Effekt im Experiment nachgestellt werden soll, überführt man die geschnittenen Paprikastreifen in ein Becherglas (400 mL), übergießt sie mit 250 mL einer wässrigen Lösung von Calciumchlorid-Dihydrat ($w = 0,03$), Natriumchlorid ($w = 0,08$) und Milchsäure ($w = 0,008$), verschließt das Gefäß luftdicht mit Parafilm und belässt sie über Nacht in diesem Reifebad.

Ergebnisse

Vgl. Kapitel 2.6.2.1 des Theoretischen Teils.

Experiment 12: Propylenglykolalginat als Emulgator in sauren Salatdressings

a) Demonstration der Emulgatoreigenschaften

Chemikalien

Propylenglykolalginat (z. B. „Protanal Ester L-25 A/H“, Firma FMC BioPolymer), Speiseöl, Weißweinessig, Sudanrot B (S: 22-24/25), entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- Propylenglykolalginat-Lösung ($\rho^* = 30 \text{ g/L}$) (zur Herstellung vgl. Versuchsdurchführung),
- Lösung von Sudanrot B in Speiseöl ($w = 0,008$).

Geräte

Becherglas (250 mL, niedrige Form), 2 Demonstrationsreagenzgläser mit passenden Gummistopfen (NS 29), Reagenzglasständer, 4 Messzylinder (25 mL), Pasteur-Pipette, Glasstab, Magnetrührer, Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$), Haushaltssieb ($d = 7 \text{ cm}$), Waage, Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen.

Durchführung

Für die Herstellung von 50 mL Propylenglykolalginat-Lösung ($\rho^* = 30 \text{ g/L}$) füllt man ein Becherglas (250 mL, niedrige Form) mit etwa 40 mL entionisiertem Wasser, versieht es mit einem Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) und platziert es auf dem Magnetrührer.

Die Rührgeschwindigkeit wird nun so stark eingestellt, dass sich ein Vortex bildet. Auf dessen obere Wand siebt man unter Zuhilfenahme des Haushaltsiebes portionsweise 1,5 g Propylenglykolalginat ein. Das entstehende Sol wird bis zur vollständigen Auflösung des Esters weitergerührt. Den in der PGA-Lösung befindlichen Rührfisch entfernt man nach Abspülen der anhaftenden Reste und füllt mit entionisiertem Wasser bis zur 50-mL-Marke des Becherglases auf. Für eine gute Durchmischung der erhaltenen Lösung wird durch kräftiges Rühren mit einem Glasstab gesorgt.

In die beiden Demonstrationsreagenzgläser bringt man nun die in Tabelle 64 aufgeführten Mischungskomponenten ein:

Tab. 64: Zusammensetzung von Salatdressings mit und ohne Propylenglykolalginat (PGA) als Emulgator.

Komponenten	Reagenzglas 1: Ansatz mit PGA	Reagenzglas 2: Vergleichsprobe ohne PGA
Propylenglykolalginat-Lösung ($\rho^* = 30 \text{ g/L}$)	20 mL	–
Entionisiertes Wasser	–	20 mL
Speiseöl	20 mL	20 mL
Weißweinessig	20 mL	20 mL
Lösung von Sudanrot B in Speiseöl ($w = 0,008$)	20 Tropfen	20 Tropfen

Nach Aufsetzen der Gummistopfen werden die Reagenzgläser gleichzeitig etwa zehn Sekunden intensiv geschüttelt und danach zur Beobachtung der Phasentrennung im Reagenzglasgestell platziert.

Während in der Vergleichsprobe ohne Emulgator schon nach wenigen Minuten eine Trennung von Öl- und Wasserphase einsetzt und nach etwa zehn Minuten deutlich erkennbar ist, weist das Propylenglykolalginat enthaltende Salatdressing eine hohe Emulsionstabilität auf, die über einen Zeitraum von mehr als einer Stunde bestehen bleibt.

b) Nachweis des Emulsions-Typs durch Leitfähigkeitsmessung

Chemikalien

Propylenglykolalginat (z. B. „Protanal Ester L-25 A/H“, Firma FMC BioPolymer), Natriumchlorid, Speiseöl, Rotweinessig, entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- Wässrige Propylenglykolalginat-Lösung (ρ^* (PGA) = 30 g/L),
- NaCl-Lösung ($c = 0,5$ mol/L),
- Natriumchloridhaltige Propylenglykolalginat-Lösung (ρ^* (PGA) = 30 g/L in NaCl-Lösung ($c = 0,5$ mol/L)).

Die Herstellung der wässrigen und der natriumchloridhaltigen Propylenalginat-Lösung erfolgt gemäß der in Experiment 12 a) beschriebenen Vorgehensweise. Die dafür erforderlichen Geräte sind der für Versuchsteil b) angegebenen Liste zu entnehmen.

Geräte

Bechergläser (2 x 100 mL; 2 x 250 mL, niedrige Form), 4 Messzylinder (25 mL), 2 Demonstrationsreagenzgläser mit passenden Gummistopfen (NS 29), Reagenzglasständer, 2 Glasstäbe, Haushaltssieb ($d = 7$ cm), Magnetrührer, 2 Rührfische ($l = 4$ cm), Leitfähigkeitsmessstab (Firma Phywe), Transformator, Amperemeter, Verbindungskabel, Stativmaterial, Waage, Spatel, Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen, Toilettenpapier.

Durchführung

Nach Fertigstellung der beiden Propylenglykolalginat-Sole füllt man zwei Demonstrationsreagenzgläser mit den in Tabelle 65 aufgeführten Mischungskomponenten:

Tab. 65: Zusammensetzung der mit Propylenglykolalginat emulgierten Salatdressings ohne und mit Natriumchlorid-Gehalt.

Komponenten	Reagenzglas 1:	Reagenzglas 2:
	Emulsion ohne NaCl	Emulsion mit NaCl
PGA-Sol ($\rho^* = 30$ g/L) in entionisiertem Wasser	20 mL	–
PGA-Sol ($\rho^* = 30$ g/L) in NaCl-Lösung ($c = 0,5$ mol/L)	–	20 mL
Speiseöl	20 mL	20 mL
Rotweinessig	20 mL	20 mL

Die Reagenzgläser werden mit Gummistopfen verschlossen und zur Durchmischung der Inhalte jeweils etwa 10 Sekunden intensiv geschüttelt.

Anschließend überführt man etwa 40 mL jeder Emulsion in ein Becherglas (100 mL) und überprüft mit Hilfe der in Abbildung 93 dargestellten Versuchsanordnung in beiden Ansätzen die Leitfähigkeit durch Messung der Stromstärke (Messbereich: 30 mA) bei einer Wechselspannung von $\sim U = 5$ V bzw. 10 V.

Der Leitfähigkeitsprüfer ist nach jeder Messung gründlich mit entionisiertem Wasser abzuspülen und vorsichtig mit einem Stück Toilettenpapier zu trocknen.

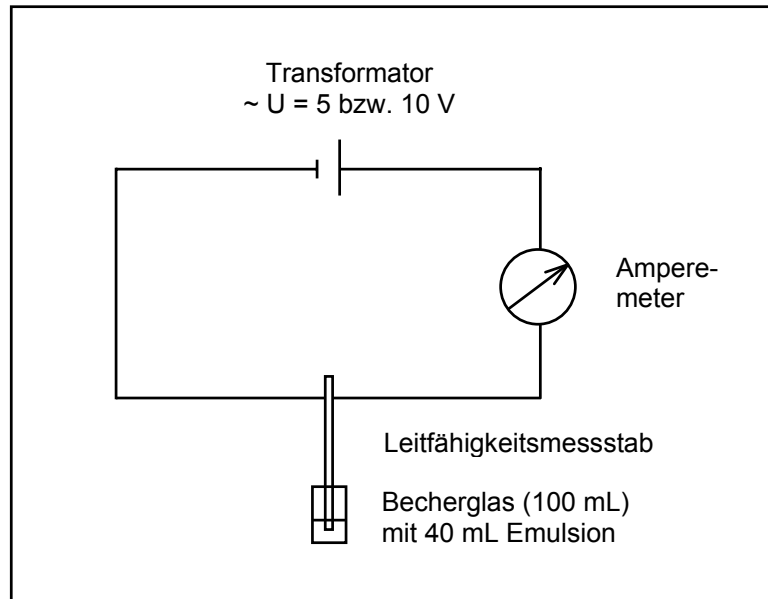


Abb. 93: Versuchsanordnung zur Bestimmung der Leitfähigkeit von mit Propylenglykolalginat emulgierten Salatdressings ohne und mit NaCl-Gehalt.

Ergebnisse

Wie die Messergebnisse in Tabelle 66 zeigen, ist im Falle der Probe mit NaCl-Zusatz eine deutlich höhere Leitfähigkeit zu beobachten als bei dem Ansatz, der lediglich entionisiertes Wasser enthält. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei einem mit Propylenglykolalginat stabilisierten Salatdressing um eine O/W-Emulsion handelt.

Tab. 66: Typische Messergebnisse des Leitfähigkeitstests zur Bestimmung des Emulsions-Typs.

Einstellungen	I/mA	
	Emulsion ohne NaCl	Emulsion ohne NaCl
~ U = 5 V Messbereich: 30 mA	2	10
~ U = 10 V Messbereich: 30 mA	4	19

2.1.4.2 Biotechnologie

Experiment 13: Immobilisierung von Hefe-Zellen in Calciumalginat-Gel

Chemikalien

Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) („Protanal LF 20/60-L“, Firma FMC BioPolymer oder „Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238), $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,2 \text{ mol/L}$), frische Backhefe, entionisiertes Wasser.

Geräte

2 Bechergläser (1 x 100 mL; 1 x 600 mL, hohe Form), Magnetrührer, Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$), Glasstab, Spritze (5 mL), Messzylinder (25 mL), Wund- und Blasenspritze (100 mL) mit Adapter, Haushaltssieb ($d = 10 \text{ cm}$), Spatel, Waage.

Durchführung

Mit Hilfe eines Glasstabes vermischt man in dem 100-mL-Becherglas 5 g frische Backhefe mit 5 mL entionisiertem Wasser und rührt in die resultierende Hefe-Suspension 20 mL Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) ein.

Die erhaltene Mischung wird nun mit der vom Stempel befreiten und mit dem Adapter versehenen Wund- und Blasenspritze in das 600-mL-Becherglas mit 200 mL langsam gerührter $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,2 \text{ mol/L}$) eingetropf (vgl. Abbildung 94). Der Abstand zwischen Adapterauslauf und Flüssigkeitsoberfläche sollte dabei etwa 4 cm betragen.

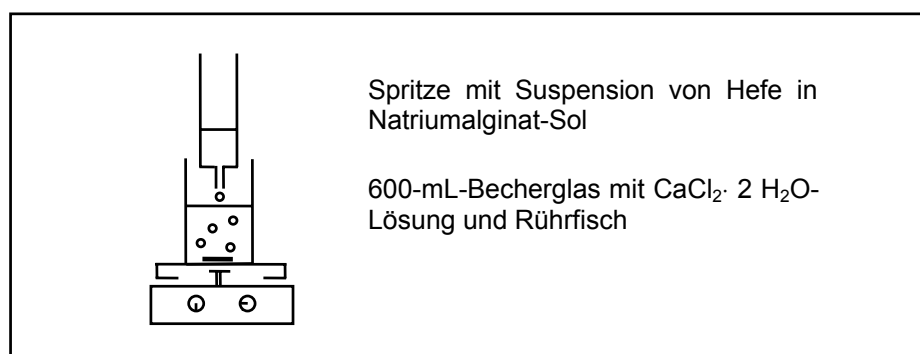


Abb. 94: Versuchsanordnung zur Immobilisierung von Hefe in Calciumalginat.

Die entstandenen Calciumalginat-Hefe-Kugeln lässt man nach Zugabe des letzten Tropfens aus der Spritze unter mäßigem Rühren 20 Minuten in der $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung aushärten. Mit Hilfe des Haushaltssiebs werden die Kugeln anschließend von der Lösung abgetrennt und gründlich mit 200 mL entionisiertem Wasser gespült. Das fertiggestellte Immobilisat wird für die Experimente 14, 15 und 16 benötigt.

Experiment 14: Qualitativer Nachweis der Gärfähigkeit von Calciumalginat-Hefe-Immobilisaten

Chemikalien

Hefe-Immobilisat aus Experiment 13, frische Backhefe, Glucose-Lösung ($c(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 0,45 \text{ mol/L}$), die zur Stabilisierung des Immobilisats Ca^{2+} -Ionen ($c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = 0,04 \text{ mol/L}$) enthält, gesättigte $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösung (vom unlöslichen Rückstand abfiltriert) (Xi; R: 41; S: 24-26-39), entionisiertes Wasser.

Geräte

Demonstrationsreagenzglas, Becherglas (1 L, hohe Form), Messzylinder (100 mL), Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$), heizbarer Magnetrührer mit Kontaktthermometer, durchbohrter Gummistopfen (NS 29), Gärrohr, Löffelspatel, Stativmaterial.

Durchführung

Das Ziel dieses Versuches besteht darin, die Gärfähigkeit des in Experiment 13 hergestellten Immobilisats von Hefe-Zellen in Calciumalginat-Gel qualitativ nachzuweisen. Dazu baut man zunächst die in Abbildung 95 skizzierte Apparatur auf. Als Wasserbad dient ein Becherglas (1 L, hohe Form). Das Glas wird mit entionisiertem Wasser gefüllt und mit einem Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) versehen. Mittels Magnetrührer und Kontaktthermometer heizt man unter Rühren auf eine Temperatur von $\vartheta_{\text{konst.}} = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ vor.

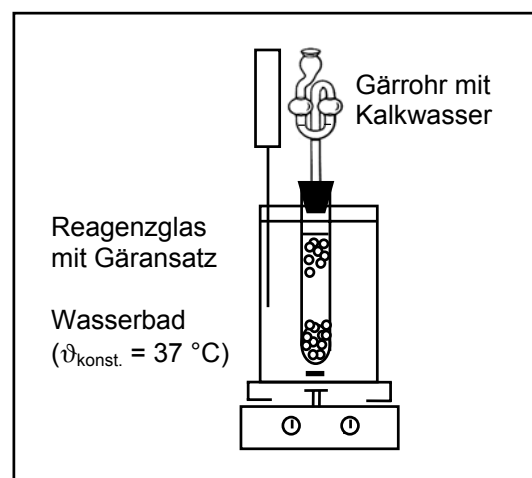


Abb. 95: Versuchsanordnung zum qualitativen Nachweis der Gärfähigkeit von Calciumalginat-Hefe-Immobilisaten.

Die Immobilisat-Kugeln aus Experiment 13 werden in ein Demonstrationsreagenzglas eingebracht und mit 50 – 60 mL der wässrigen Lösung von Glucose-Monohydrat und Calciumchlorid-Dihydrat versetzt.

Das Reagenzglas verschließt man mit einem durchbohrten Gummistopfen, der ein mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösung gefülltes Gärrohr trägt. Das Gärrohr sollte nur bis zur unteren Stopfenkante in das Bohrloch gesteckt werden, da es sonst im Laufe des Versuches leicht durch aufsteigende Immobilisat-Kugeln verstopft. Die Reaktionsmischung wird anschließend bei $\vartheta_{\text{konst.}} = 37\text{ }^\circ\text{C}$ im vorgeheizten Wasserbad erwärmt.

Nach etwa zehn Minuten steigen die ersten Immobilisat-Perlen nach oben, und nach einer Reaktionszeit von 15 – 20 Minuten ist in dem Gärrohr eine deutliche weiße Trübung zu erkennen.

Experiment 15: Quantitative Bestimmung der Gärleistungen von Hef- Immobilisaten und freien Hefe-Zellen
--

Chemikalien

Hefe-Immobilisat aus Experiment 13, frische Backhefe, Glucose-Lösung ($c(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 0,45\text{ mol/L}$), die zur Stabilisierung des Immobilisats Ca^{2+} -Ionen ($c(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 0,04\text{ mol/L}$) enthält, gesättigte $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösung (vom unlöslichen Rückstand abfiltriert) (**Xi**; R: 41; S: 24-26-39), entionisiertes Wasser.

Geräte

Bechergläser (1 x 100 mL; 1 x 250 mL, niedrige Form), Kristallisierschale ($d = 14\text{ cm}$), 2 Stickstoffkolben (250 mL, NS 29) mit Hahn und Schliffstopfen (NS 29) (ersatzweise: 2 Rundkolben (250 mL) mit gewinkelten Absaugstücken (NS 29)), Kolbenprober (100 mL) mit Dreiwegehahn und passendem Halter, 2 Saugrohre ($d = 1,8\text{ cm}$, $l = 16\text{ cm}$) mit durchbohrten Gummistopfen (NS 14,5), 2 gewinkelte Glasrohre (1 x Schenkellängen: $l_1, l_2 = 7\text{ cm}$; 1 x Schenkellängen: $l_1 = 3,5\text{ cm}$, $l_2 = 20\text{ cm}$), 2 Spritzen (5 mL; ohne Kanülen), Glasstab, 2 Pulvertrichter (NS 29), heizbarer Magnetrührer mit Kontaktthermometer, 3 Rührfische (2 x 3 cm, 1 x 4 cm Länge), 2 Gummiwischer, PVC-Schlauch, 2 Aluminiumbänder (NS 29), 2 Sicherungsfedern, Stativmaterial, Hebebühne, Waage, Stoppuhr, Stabthermometer, Haushaltssieb ($d = 9\text{ cm}$), Glastrichter ($d = 7\text{ cm}$), Faltenfilter ($d = 12,5\text{ cm}$), Weithalslerlenmeyerkolben (250 mL).

Durchführung

Das Ziel dieses Versuchs besteht darin, die Gärleistung des in Experiment 13 hergestellten Immobilisats von Hefe-Zellen in Calciumalginat-Gel mit der einer Hefe-Suspension zu vergleichen. Als Substrat kommt dabei eine Glucose-Lösung ($c = 0,45 \text{ mol/L}$) zum Einsatz, die zur Stabilisierung des Immobilisats Ca^{2+} -Ionen ($c = 0,04 \text{ mol/L}$) enthält.

Für den Versuch wird zunächst die in Abbildung 96 skizzierte Apparatur aufgebaut.

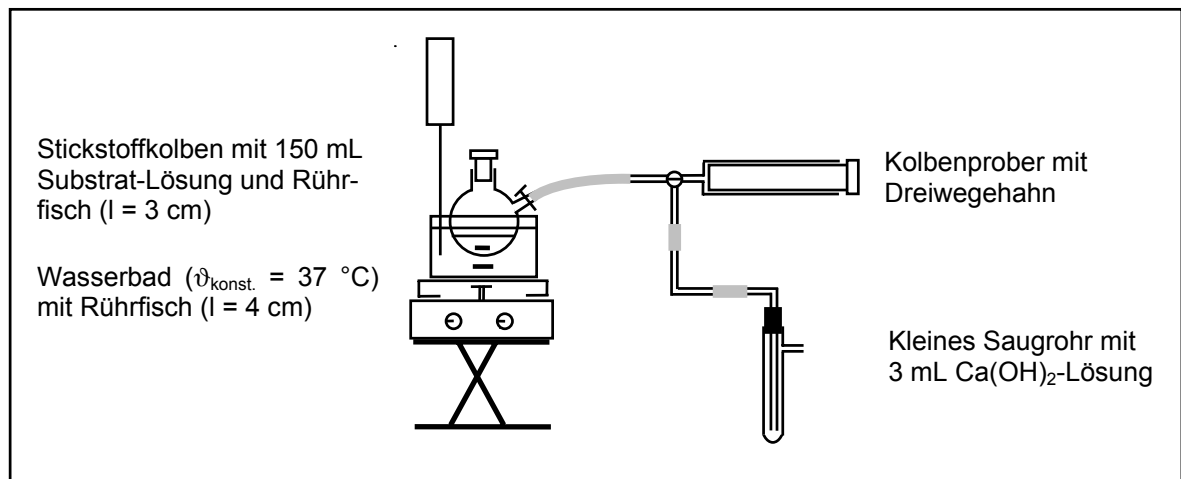


Abb. 96: Versuchsanordnung zur quantitativen Bestimmung der Gärleistungen des Immobilisats von Hefe in Calciumalginat-Gel bzw. der Hefe-Suspension.

Nach Vorheizen des Wasserbades auf $\vartheta_{\text{konst.}} = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ füllt man einen Stickstoffkolben mit 150 mL Glucose-Lösung und erwärmt diese bei mittlerer Rührgeschwindigkeit auf Wasserbadtemperatur (Überprüfung mittels Stabthermometer).

Sobald die gewünschte Temperatur erreicht ist, wird unter Zuhilfenahme eines Pulvertrichters und eines Gummiwischers das in Experiment 13 hergestellte Hefe-Immobilisat quantitativ in den Stickstoffkolben eingebracht. Der Kolben ist anschließend zügig mit einem Glasschliffstopfen zu verschließen. Um die Dichtigkeit der Apparatur zu gewährleisten, fixiert man den Stopfen zusätzlich mit einer Sicherungsfeder.

Unter Starten der Stoppuhr wird der Hahn des auf die Nullmarke eingestellten Kolbenprobers in die korrekte Position gebracht. Dann rührt man die temperierte Reaktionsmischung etwa 30 Minuten mit mäßiger Geschwindigkeit und liest dabei so lange im 30-Sekunden-Takt das Volumen des gebildeten Gases am Kolbenprober ab, bis die 100-mL-Marke überschritten wird.

Nach Abbruch der Reaktion wird nachgewiesen, dass es sich bei dem gebildeten Gas um Kohlenstoffdioxid handelt. Dazu leitet man nach Umschalten des Dreiwegehahns langsam 40 mL des im Kolbenprober enthaltenen Gasgemisches in das mit 3 mL Kalkwasser gefüllte Saugrohr ein. Der unter diesen Bedingungen gebildete Niederschlag von weißem Calciumcarbonat unterscheidet sich deutlich von der leichten Trübung, die bei Einleitung von 40 mL Luft in 3 mL $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösung entsteht.

Zum Vergleich bestimmt man anschließend die Gärleistung einer Hefe-Suspension, deren Biokatalysator-Gehalt dem des Immobilisats entspricht. Zu diesem Zweck werden zunächst 5 g frische Backhefe in einem 100-mL-Becherglas eingewogen und unter Rühren mit einem Glasstab in 5 mL entionisiertem Wasser suspendiert. Damit bezüglich der Temperatur und des Quellungsgrades der Hefe eine Vergleichbarkeit mit dem Immobilisat gewährleistet ist, lässt man die Hefe-Suspension 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen, bevor ihre Gäraktivität bestimmt wird. Dies entspricht etwa der Eintropf- und Aushärtezeit des Calciumalginat-Hefe-Immobilisates.

Mit Hilfe der in Abbildung 96 dargestellten Apparatur erwärmt man in der Zwischenzeit in dem zweiten Stickstoffkolben 150 mL Glucose-Lösung bei mäßiger Rührgeschwindigkeit auf 37 °C. Das für den qualitativen CO₂-Nachweis verwendete Saugrohr wird in der Zwischenzeit durch ein neues mit 3 mL Ca(OH)₂-Lösung gefülltes Rohr ausgetauscht. Sobald die Glucose-Lösung die gewünschte Temperatur erreicht hat, überführt man die hergestellte Hefe-Suspension unter Einsatz eines Pulvertrichters sowie eines Gummiwischers möglichst vollständig in den Stickstoffkolben und verschließt diesen sorgfältig mittels Glasschliffstopfen und Sicherungsfeder. Die Messung des gebildeten Gasvolumens erfolgt in Analogie zur bereits für das Hefe-Immobilisat beschriebenen Vorgehensweise. Nach Beendigung der Reaktion wird wiederum nachgewiesen, dass es sich bei dem entstandenen Gas um Kohlenstoffdioxid handelt.

Am Ende des Versuchs überprüft man noch die unterschiedliche Abtrennbarkeit der immobilisierten und nicht immobilisierten Hefe-Zellen vom Reaktionsmedium. Dazu wird zunächst der immobilisathaltige Reaktionsansatz durch ein Haushaltssieb (d = 9 cm) in ein Becherglas (250 mL) abgegossen. Das dabei erhaltene Filtrat ist klar und augenscheinlich hefefrei. Eine unter Umständen beobachtbare leichte Gelbfärbung wird vermutlich durch in Lösung gegangenes Natriumalginat verursacht.

Im Falle der nicht immobilisierten Hefe-Zellen gelingt die vollständige Abtrennung der Mikroorganismen von der Substrat-Lösung jedoch auch dann nicht, wenn für die Filtration ein Glastrichter (d = 7 cm) und ein Faltenfilter (d = 12,5 cm) eingesetzt werden.

Ergebnisse

Vgl. Kapitel 2.6.3.3 des Theoretischen Teils.

Experiment 16: Halbquantitative Abschätzung der Gäraktivitäten von Hefe-Immobilisaten und freien Hefe-Zellen**Chemikalien**

Hefe-Immobilisat aus Experiment 13, frische Backhefe, Glucose-Lösung ($c(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 0,45 \text{ mol/L}$), die zur Stabilisierung des Immobilisats Ca^{2+} -Ionen ($c(\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = 0,04 \text{ mol/L}$) enthält, gesättigte $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösung (vom unlöslichen Rückstand abfiltriert) (Xi; R: 41; S: 24-26-39), entionisiertes Wasser.

Geräte

Becherglas (100 mL), 2 Kristallisierschalen (1 x 14 cm; 1 x 23 cm Durchmesser), 2 Stickstoffkolben (250 mL, NS 29) mit Hahn und Schliiffstopfen (NS 29) (ersatzweise: 2 Rundkolben (250 mL) mit gewinkelten Absaugstücken (NS 29)), 2 Messzylinder (100 mL), Uhrglas ($d = 3 \text{ cm}$), Frischhaltefolie, Glasstab, 2 Spritzen (1 x 5 mL; 1 x 10 mL; jeweils ohne Kanülen), 2 Pulvertrichter (NS 29), heizbarer Magnetrührer mit Kontaktthermometer, 3 Rührfische (2 x 3 cm; 1 x 4 cm Länge), 2 Gummiwischer, PVC-Schlauch, 2 Aluminiumbänder (NS 29), 2 Sicherungsfedern, Stativmaterial, Hebebühne, Waage, Stoppuhr, Stabthermometer, Haushaltssieb ($d = 9 \text{ cm}$), Becherglas (250 mL, niedrige Form), Glastrichter ($d = 7 \text{ cm}$), Faltenfilter ($d = 12,5 \text{ cm}$), Weithalslerlenmeyerkolben (250 mL).

Durchführung

Der vorliegende Versuch bietet die Möglichkeit, die Gäraktivität des Hefe-Immobilisates aus Experiment 13 auf etwas vereinfachte Weise halbquantitativ abzuschätzen und mit der Fermentationsleistung einer äquivalenten Menge freier Hefe-Zellen zu vergleichen. Als Substrat wird dabei wiederum eine Glucose-Lösung ($c = 0,45 \text{ mol/L}$) verwendet, die zur Stabilisierung des Immobilisats Ca^{2+} -Ionen ($c = 0,04 \text{ mol/L}$) enthält.

Für das Experiment wird zunächst die in Abbildung 97 dargestellte Apparatur aufgebaut.

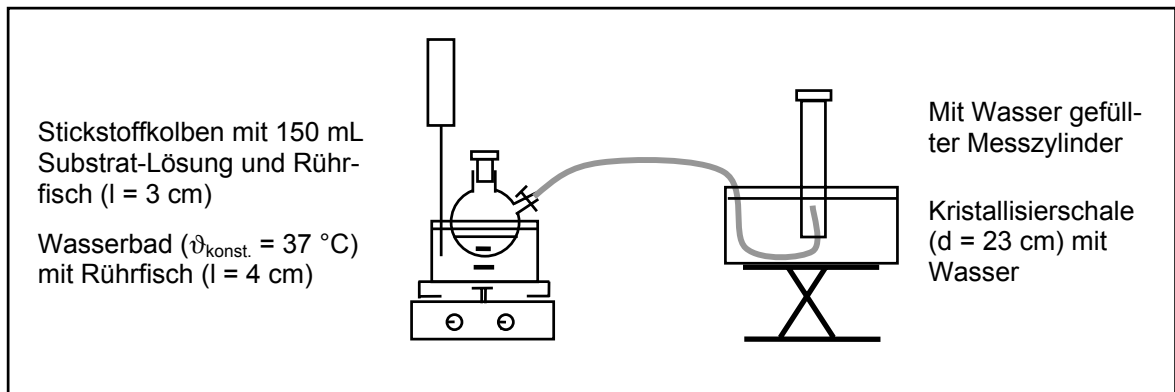


Abb. 97: Versuchsanordnung zur halbquantitativen Abschätzung der Gärleistungen des Immobilisats von Hefe in Calciumalginat-Gel bzw. der Hefe-Suspension.

Aufgrund der Tatsache, dass der eingesetzte graduierte 100-mL-Messzylinder über eine Ausgießhilfe verfügt, ist das Einbringen des mit Wasser gefüllten Zylinders in die pneumatische Wanne immer mit einem kleinen Flüssigkeitsverlust verbunden, wenn zum Verschließen ein Uhrglas verwendet wird. Dieses Problem lässt sich umgehen, wenn man stattdessen den Messzylinder mit Frischhaltefolie abdichtet und diese unter Wasser wieder entfernt.

Für die Abschätzung der Gärleistung des Hefe-Immobilisates heizt man zunächst das Wasserbad auf $\vartheta_{\text{konst.}} = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vor, füllt dann einen der beiden Stickstoffkolben mit 150 mL Glucose-Lösung und erwärmt diese bei mittlerer Rührgeschwindigkeit auf Wasserbadtemperatur (Überprüfung mittels Stabthermometer).

Sobald die gewünschte Temperatur erreicht ist, wird unter Zuhilfenahme eines Pulvertrichters und eines Gummiwischers das in Experiment 13 hergestellte Hefe-Immobilisat quantitativ in den Stickstoffkolben eingebracht. Der Kolben ist anschließend zügig mit einem Glasschliffstopfen zu verschließen. Um die Dichtigkeit der Apparatur zu gewährleisten, fixiert man den Stopfen zusätzlich mit einer Sicherungsfeder.

Zur Bestimmung der Gäraktivität der immobilisierten Hefe-Zellen rührt man den temperierten Reaktionsansatz etwa 30 Minuten mit mäßiger Geschwindigkeit und liest so lange in einminütigen Abständen das Volumen des im Messzylinder aufgefangenen Gases ab, bis die 100-mL-Marke überschritten wird.

Anschließend wartet man, bis der Messzylinder vollständig mit CO_2 gefüllt ist, verschließt ihn unter Wasser mit einem Uhrglas und entnimmt ihn aus der Apparatur. Das darin enthaltene Kohlenstoffdioxid lässt sich qualitativ durch schnelles Einspritzen von 10 mL $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösung nachweisen.

Zum Vergleich bestimmt man anschließend die Gärleistung einer Hefe-Suspension, deren Biokatalysator-Gehalt dem des Immobilisats entspricht. Zu diesem Zweck werden zunächst 5 g frische Backhefe in einem 100-mL-Becherglas eingewogen und unter Rühren mit einem Glasstab in 5 mL entionisiertem Wasser suspendiert. Um bezüglich der Temperatur und des Quellungsgrades der Hefe eine Vergleichbarkeit mit dem Immobilisat zu er-

reichen, lässt man die Hefe-Suspension vor Bestimmung ihrer Gäraktivität 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Dies entspricht etwa der Zeit, die bei der Herstellung des Hefe-Immobilisates für das Eintropfen und Aushärten erforderlich ist.

In der Zwischenzeit erwärmt man mit Hilfe der in Abbildung 97 dargestellten Apparatur in dem zweiten Stickstoffkolben 150 mL der Ca^{2+} -haltigen Glucose-Lösung bei mittlerer Rührgeschwindigkeit auf 37 °C. Sobald die Substrat-Lösung die gewünschte Temperatur erreicht hat, überführt man die hergestellte Hefe-Suspension unter Einsatz eines Pulvertrichters sowie eines Gummiwischers möglichst vollständig in den Stickstoffkolben und verschließt diesen sorgfältig mittels Glasschliffstopfen und Sicherungsfeder. Die Messung des gebildeten Gasvolumens erfolgt in Analogie zur bereits für das Hefe-Immobilisat beschriebenen Vorgehensweise. Nach Beendigung der Reaktion wird wiederum nachgewiesen, dass es sich bei dem entstandenen Gas um Kohlenstoffdioxid handelt.

Um die unterschiedliche Abtrennbarkeit der eingesetzten Biokatalysatoren vom Reaktionsmedium zu überprüfen, gießt man abschließend den immobilisathaltigen Reaktionsansatz durch ein Haushaltssieb ($d = 9 \text{ cm}$). Das in einem 250-mL-Becherglas aufgefangene Filtrat ist praktisch frei von Hefe-Trübungen. Eine unter Umständen beobachtbare leichte Gelbfärbung kann durch in Lösung gegangenes Natriumalginat verursacht werden. Im Gegensatz dazu lassen sich die freien Hefe-Zellen auch durch Filtration mittels Glasrichter ($d = 7 \text{ cm}$) und Faltenfilter ($d = 12,5 \text{ cm}$) nicht vollständig von der Substrat-Lösung abtrennen.

Ergebnisse

Vgl. Kapitel 2.6.3.3 des Theoretischen Teils.

Experiment 17: Untersuchung der Gärfähigkeit eines nach der internen Gelbildungsmethode hergestellten Immobilisates von Hefe in einem Calciumalginat-Zylinder mit Kanälen

a) Herstellung des Immobilisates nach der internen Gelbildungsmethode

Chemikalien

Wässrige Lösung eines guluronatreichen Natriumalginates ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) („Protanal LF 60“, Firma Pronova Biopolymer) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), Tricalciumdicitrat-Tetrahydrat, D-Gluconsäure-5-lacton (S: 24/25), frische Bäckerhefe, entionisiertes Wasser.

Geräte

3 Bechergläser (2 x 25 mL; 1 x 100 mL), speziell angefertigt Gelbildungsapparatur (herzustellen aus Demonstrationsreagenzglas, 2 Korkstopfen (1 x NS 24; 1 x NS 29) sowie 7 Glasstäben ($l = 26 \text{ cm}$, $d = 0,35 \text{ cm}$)), Haushaltsmesser, Korkbohrmaschine, Messzylinder (100 mL), 3 Glasstäbe, Gummiwischer, Stativmaterial, Waage.

Durchführung

Bei der Anfertigung der Gelbildungsapparatur geht man folgendermaßen vor: Vom unteren Ende eines Korkstopfens (NS 29) schneidet man mit einem Haushaltsmesser eine Scheibe mit den Abmessungen $d_1 = 3 \text{ cm}$, $d_2 = 2,8 \text{ cm}$ und $h = 0,8 \text{ cm}$ ab (vgl. Abbildung 98 a)). Als Ausgangsmaterial für eine zweite Korkscheibe ist ein Stopfen (NS 24) zu verwenden. Von dessen oberem Ende wird eine Scheibe mit den Durchmessern von $d_1 = 2,5 \text{ cm}$ und $d_2 = 2,3 \text{ cm}$ sowie einer Höhe von $h = 1 \text{ cm}$ abgeschnitten (vgl. Abbildung 98 b)). Unter Verwendung einer Korkbohrmaschine versieht man die beiden Scheiben, wie in Abbildung 99 dargestellt, jeweils mit sieben Bohrlöchern.

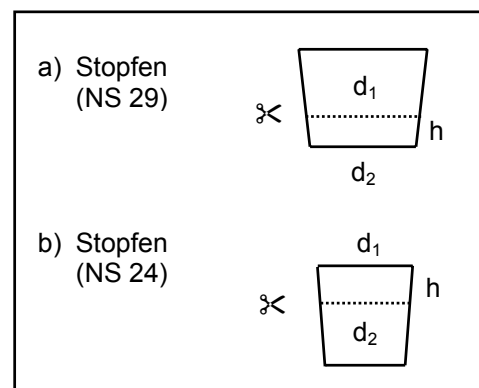


Abb. 98: Bearbeitung der Korkstopfen.

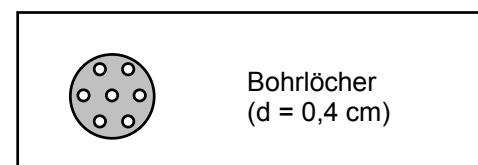


Abb. 99: Durchbohrte Korkscheibe (Radialschnitt).

Durch die Bohrlöcher der beiden Korkscheiben werden sieben Glasstäbe ($l = 26 \text{ cm}$, $d = 0,35 \text{ cm}$) gesteckt. Die resultierende Stabkonstruktion passt man in ein Demonstrationsreagenzglas ein. Dabei sollte die aus dem Stopfen (NS 29) zugeschnittene größere Korkscheibe das Reagenzglas verschließen (vgl. Abbildung 100).

Die auf die beschriebene Weise angefertigte Apparatur wird abschließend an einem Stativ befestigt.

Nach der internen Gelbildungsmethode wird nun wie folgt ein Immobilisat von Hefe-Zellen in Calciumalginat hergestellt: Zunächst schlämmt man in einem 100-mL-Becherglas unter Rühren mit einem Glasstab 5 g frische Bäckerhefe in 5 g entionisiertem Wasser auf.

Die Hefe-Suspension wird anschließend gründlich mit 60 mL Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) vermischt und anschließend mit einer Aufschlammung von 1,14 g Tricalciumdicitrat-Tetrahydrat in 10 g entionisiertem Wasser versetzt, die zuvor in einem 25-mL-Becherglas vorbereitet wurde. In die resultierende Masse wird abschließend eine Lösung von 1 g D-Gluconsäure-5-lacton in 10 g entionisiertem Wasser eingebracht. Für eine gute Durchmischung sorgt man jeweils durch Rühren mittels Glasstab.

Die auf diese Weise angesetzte Reaktionsmischung beginnt sehr bald zu gelieren und muss daher zügig in die in Abbildung 100 dargestellte Apparatur eingebracht werden. Dazu schiebt man die obere Korkplatte der Stabkonstruktion so weit von der Öffnung des Reagenzglases weg, dass die Mischung in die zwischen den Glasstäben befindlichen Hohlräume eingefüllt werden kann. Um eine möglichst verlustfreie Überführung des Ansatzes aus dem 100-mL-Becherglas in das mit der Stabkonstruktion ausgestattete Demonstrationsreagenzglas sicherzustellen, setzt man einen Gummiwischer ein. Bis zur vollständigen Gelierung verbleibt die Reaktionsmischung zwei Stunden in der Apparatur. Der entstandene zylinderförmige Gelblock lässt sich dann leicht aus dem Demonstrationsreagenzglas lösen. Nach Entfernung der Glasstäbe und Korkscheiben wird abschließend die Gesamtmasse des Immobilisates bestimmt.

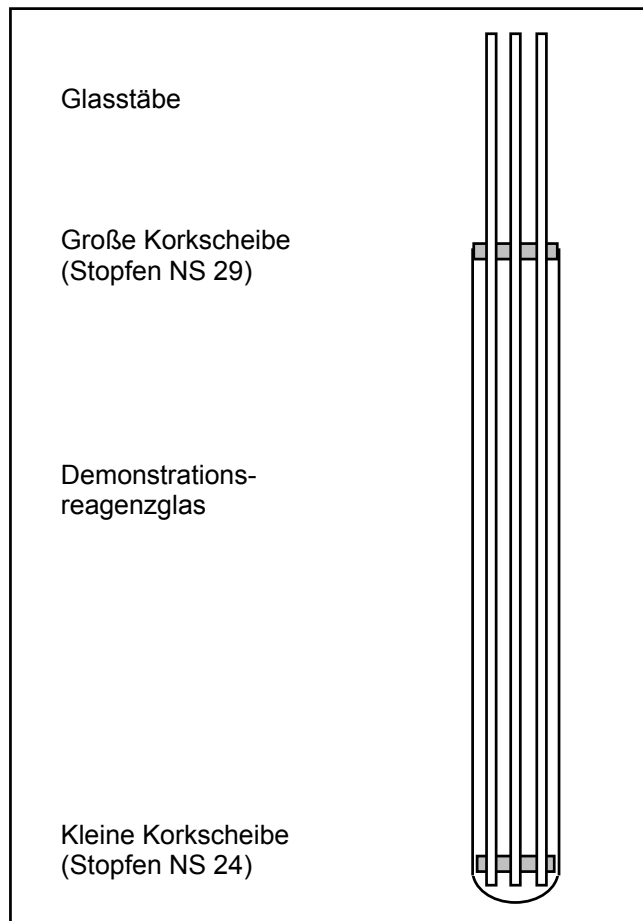


Abb. 100: Anzufertigende Spezialapparatur (Vertikalschnitt).

b) Überprüfung der Gärleistung des hergestellten Spezialimmobilisates

Chemikalien

Spezialimmobilisat von Hefe in Calciumalginat aus Versuchsteil a), Glucose-Monohydrat-Lösung (ρ^* ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) = 75 g/L), gesättigte $Ca(OH)_2$ -Lösung (vom unlöslichen Rückstand abfiltriert) (Xi; R: 41; S: 24-26-39).

Geräte

Becherglas (800 mL, hohe Form), Demonstrationsreagenzglas, Kolbenprober (100 mL) mit Dreiwegehahn und passendem Halter, 2 Saugrohre ($d = 1,8$ cm, $l = 16$ cm) mit durchbohrten Gummistopfen (NS 14,5), 3 gewinkelte Glasrohre (2 x Schenkellängen: $l_1, l_2 = 7$ cm; 1 x Schenkellängen: $l_1 = 3,5$ cm, $l_2 = 20$ cm), 2 Spritzen (5 mL; ohne Kanülen), heizbarer Magnetrührer mit Kontaktthermometer, Rührfisch ($l = 4$ cm), durchbohrter Gummistopfen (NS 29), PVC-Schlauch, Schlauchverbindungsstück, Stoppuhr, Waage.

Durchführung

Für das Experiment baut man zunächst die in Abbildung 101 dargestellte Apparatur auf:

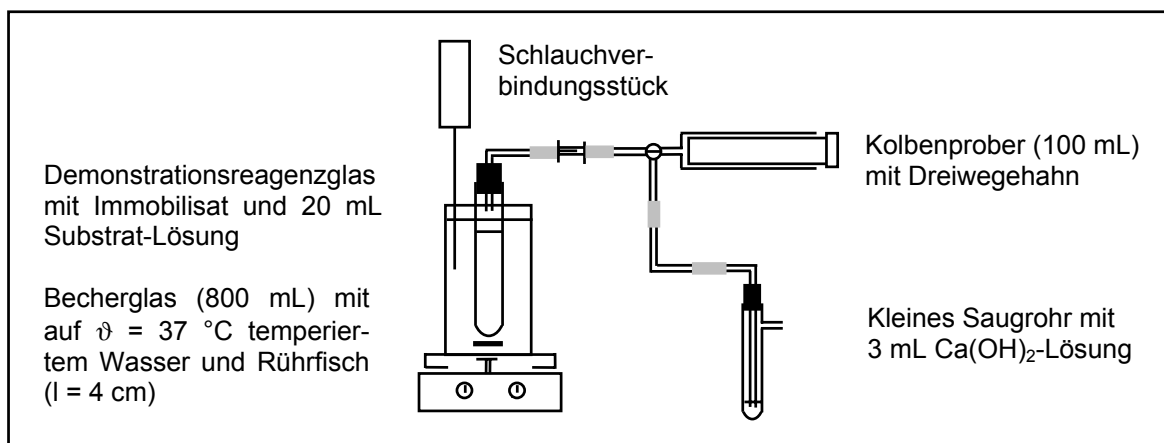


Abb. 101: Versuchsanordnung zur Untersuchung der Gärfähigkeit des nach der internen Gelbildungsmethode hergestellten Spezialimmobilisates von Hefe-Zellen in Calciumalginat.

Das Wasserbad wird mittels Magnetrührer und Kontaktthermometer auf $\vartheta = 37$ °C vorgeheizt. Eine gute Durchmischung führt man dabei durch Rühren mit einem Rührfisch ($l = 4$ cm) herbei.

Nach Einstellung einer konstanten Badtemperatur wird die Gärleistung des nach der internen Gelbildungsmethode hergestellten Immobilisates von Hefe-Zellen in Calciumalginat bestimmt.

Dazu schneidet man mit einem Haushaltsmesser von dem in Versuchsteil a) erhaltenen Gelzylinder ein Stück ab, dessen Masse etwa 60 % der Gesamtmasse des Immobilisates entspricht.

Das Immobilisat wird dann in das in Abbildung 101 dargestellte Demonstrationsreagenzglas eingebracht. Nach Einfüllen von 20 mL $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ -Lösung ($\rho^* = 75 \text{ g/L}$) setzt man auf das Reagenzglas den mit einem Glaswinkelrohr versehenen durchbohrten Gummistopfen auf, schließt das Schlauchverbindungsstück und bringt den Dreiwegehahn unter Ingangsetzen der Stoppuhr in die korrekte Position. Das Volumen des im Reaktionsansatz gebildeten Gases wird am Kolbenprober in Minutenabständen abgelesen und notiert. Sobald 100 mL Gas entstanden sind, bricht man die Reaktion ab.

Um qualitativ nachzuweisen, dass es sich bei dem gebildeten Gas wieder um Kohlenstoffdioxid handelt, werden nach Umschalten des Dreiwegehahns langsam 40 mL des im Kolbenprober enthaltenen Gasgemisches in das mit 3 mL Kalkwasser gefüllte Saugrohr eingeleitet. Der unter diesen Bedingungen gebildete Niederschlag von weißem Calciumcarbonat unterscheidet sich deutlich von der leichten Trübung, die bei Einleitung von 40 mL Luft in 3 mL $Ca(OH)_2$ -Lösung entsteht.

Ergebnisse

Vgl. Kapitel 2.6.3.3 des Theoretischen Teils.

Experiment 18: Gewinnung von Ethanol aus Molke mit Coimmobilisaten von Hefe und kovalent an die Alginat-Matrix gebundener β -Galactosidase (EC 3.2.1.23)

a) Kovalente Bindung der β -Galactosidase an die Alginat-Matrix und Herstellung der Coimmobilisate

Chemikalien

Natriumacetat-Trihydrat, konzentrierte Essigsäure ($w = 1$) (C; R: 10-35, S: 23.2-26-45), Calciumchlorid-Dihydrat (Xi; R: 36, S: 22-24), guluronatreiches Natriumalginat („Protanal LF 60“, Firma Pronova Biopolymer), mannuronatreiches Natriumalginat („Protanal LF 60-L“, Firma Pronova Biopolymer), N-Hydroxysuccinimid, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) (Xi; R: 36/37/38, S: 26-36), β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*), frische Backhefe, entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH = 5,0; c (Acetat) = 0,0666 mol/L, c (Essigsäure) = 0,0334 mol/L),
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,1$ mol/L in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH = 5,0),
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,01$ mol/L in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH = 5,0),
- guluronatreiches Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 50$ g/L),
- mannuronatreiches Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 50$ g/L),
- guluronatreiches Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 33,3$ g/L).

Zur Vorgehensweise bei der Herstellung der drei Natriumalginat-Lösungen vgl. Versuchsdurchführung.

Geräte

11 Bechergläser (4 x 25 mL; 2 x 50 mL; 2 x 100 mL; 1 x 250 mL, niedrige Form; 2 x 600 mL, hohe Form), 4 Erlenmeyerschiffkolben (100 mL, NS 29), 4 Glasschliffstopfen (NS 29), Vollpipette (5 mL), 10 Glasstäbe, 3 Magnetrührer (davon einer heizbar), Rührfische (2 x 3 cm, dicke Form; 3 x 4 cm; 2 x 5 cm), 2 Wund- und Blasenspritzen (100 mL) mit Adapter (Innendurchmesser der Auslaufspitze: $d = 1,5$ mm), 3 Haushaltssiebe (1 x 7 cm; 2 x 10 cm Durchmesser), 4 Gummiwischer, 4 Pulvertrichter (NS 29), 4 Sicherungsfedern, 4 Aluminiumbänder (NS 29), Stabthermometer, Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen, 2 Spatel, Stativmaterial, Stoppuhr, Waage, Kühlschrank.

Durchführung

Die Herstellung der beiden hochkonzentrierten Natriumalginat-Sole ($\rho^* = 50 \text{ g/L}$) unterscheidet sich von der normalerweise in diesem Zusammenhang praktizierten Vorgehensweise (vgl. Experiment 2) und soll daher zunächst im Detail am Beispiel der Lösung des Natriumalginats mit hohem Guluronat-Anteil beschrieben werden: In einem Becherglas (50 mL) erhitzt man unter Rühren mittels Magnetprüher und Rührfisch (l = 3 cm, dicke Form) 20 mL entionisiertes Wasser zum Sieden und fügt nach Abschalten der Heizung unter Verwendung eines Spatels portionsweise 1 g guluronatreiches Natriumalginat hinzu. Das entstehende Sol muss so lange weiter gerührt werden, bis sich das Algenpolysaccharid vollständig gelöst hat. Dies kann zunächst mit Hilfe des Magnetprühers erfolgen. Aufgrund der stark zunehmenden Viskosität des Sols ist gegen Ende des Lösungsprozesses jedoch ein Glasstab einzusetzen. Aus dem bis zur Homogenisierung gerührten Natriumalginat-Sol entfernt man unter Abspülen den Rührfisch sowie den Glasstab und füllt mit entionisiertem Wasser bis zur 20-mL-Marke des Becherglases auf. Für eine gute Durchmischung des Sols wird durch Rühren mit einem sauberen Glasstab gesorgt. Die gleichkonzentrierte Lösung des Natriumalginats mit hohem Mannuronat-Anteil wird anschließend auf analoge Weise zubereitet.

Das Ansetzen von 100 mL des guluronatreichen Natriumalginat-Sols ($\rho^* = 33,3 \text{ g/L}$) erfolgt nach der in Experiment 2 beschriebenen Methode. Die dafür erforderlichen Geräte sind in der für den vorliegenden Versuch angegebenen Liste aufgeführt.

Bei der Herstellung der beiden Coimmobilisate von β -Galactosidase und Hefe in Calciumalginat wird zunächst das Enzym kovalent an ein guluronat- bzw. mannuronatreiches Alginat gebunden: Dazu löst man in zwei Bechergläsern (25 mL) jeweils 0,160 g N-Hydroxysuccinimid und 0,140 g N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) in 5 mL entionisiertem Wasser. Die beiden Lösungen werden mit Glasstäben gründlich durchmischt und unter Zuhilfenahme von Pulvertrichtern (NS 29) in zwei Erlenmeyerschiffkolben (100 mL, NS 29) überführt, von denen einer 10 g guluronatreiches Natriumalginatsol ($\rho^* = 50 \text{ g/L}$) und der andere die entsprechende Menge der gleichkonzentrierten Lösung des Natriumalginats mit hohem Mannuronat-Anteil enthält. Unter Rühren mittels Magnetprüher und Rührfisch (l = 5 cm) lässt man die beiden Mischungen 15 Minuten lang reagieren. In der Zwischenzeit werden in zwei Bechergläsern (25 mL) jeweils 0,250 g β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*) in 5 mL entionisiertem Wasser gelöst. Um für eine gute Durchmischung der Lösungen zu sorgen, verwendet man dabei Glasstäbe.

Die hergestellten Enzym-Lösungen werden anschließend unter Einsatz von Gummiwischern möglichst verlustfrei in die Reaktionsmischungen eingebracht, die sich in den beiden Erlenmeyerkolben befinden. Nach zweiminütiger Rührzeit verschließt man die Kolben jeweils mit Glasschliffstopfen (NS 29) und sichert diese durch Anbringen von Federn. Die

Ansätze sind zur Vervollständigung der kovalenten Bindung von β -Galactosidase an die Alginat mit hohem Guluronat- bzw. Mannuronat-Gehalt 20 – 24 Stunden im Kühlschrank aufzubewahren. Die Rührfische ($l = 5 \text{ cm}$) belässt man dabei in den Kolben.

Nach Ablauf dieser Zeit verarbeitet man die beiden Ansätze folgendermaßen weiter: In zwei Bechergläsern (100 mL) werden unter Einsatz von Glasstäben jeweils 5 g frische Backhefe in 25 mL Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$). In die Hefe-Suspensionen rührt man anschließend je 30 g guluronatreiches Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 33,3 \text{ g/L}$) ein. Die hergestellten Mischungen werden unter Zuhilfenahme von Gummiwischern durch Pulvertrichter (NS 29) möglichst verlustfrei in die beiden Erlenmeyerschiffkolben mit den am Vortag zubereiteten Reaktionsansätzen überführt. Zur Durchmischung der Kolbeninhalte rührt man jeweils drei Minuten mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 5 \text{ cm}$).

Unter Verwendung zweier mit Adaptern ausgestatteter Wund- und Blasenspritzen (100 mL) werden die resultierenden Mischungen in Bechergläser (600 mL, hohe Form) mit 250 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,1 \text{ mol/L}$ in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$)) eingetropft (zur Versuchsanordnung vgl. Experiment 13). Für eine gute Durchmischung der Gelierbäder ist dabei durch kontinuierliches Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) bei mittlerer Geschwindigkeit zu sorgen. Der Abstand zwischen Adapterausgang und Flüssigkeitsoberfläche sollte jeweils etwa 4 cm betragen.

Nach Zugabe des letzten Tropfens aus der Spritze lässt man die kugelförmigen Coimmobilisate von β -Galactosidase und Hefe in Calciumalginat jeweils drei Stunden in den mäßig gerührten Calciumchlorid-Lösungen aushärten. Die Immobilisat-Kugeln der beiden Ansätze werden daraufhin mit Hilfe zweier Haushaltssiebe ($d = 10 \text{ cm}$) von den Gelierbädern abgetrennt und mit je 200 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,01 \text{ mol/L}$ in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$)) gespült. Bis zu ihrer Verwendung bewahrt man die gewaschenen Immobilisat-Kugeln in zwei Erlenmeyerschiffkolben (100 mL, NS 29) mit je 50 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,01 \text{ mol/L}$ in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$)) im Kühlschrank auf. Die Kolben sind mit Glasschliffstopfen zu verschließen und durch Federn zu sichern.

b) Verwendung der Coimmobilisate zur Konvertierung der in Molke enthaltenen Lactose und Vergleich der Umsatzraten

Chemikalien

Coimmobilisate von β -Galactosidase und Hefe in Calciumalginat aus Versuchsteil a), Sauermolke, Natriumhydroxid (**C**; R: 35, S: 26-37/39-45), Calciumhydroxid (**Xi**; R: 41, S: 22-24-26-39), Natriumacetat-Trihydrat, konzentrierte Essigsäure ($w = 1$) (**C**; R: 10-35, S: 23.2-26-45), Calciumchlorid-Dihydrat (**Xi**; R: 36, S: 22-24), entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- Natronlauge ($c = 5 \text{ mol/L}$),
- Gesättigte Ca(OH)_2 -Lösung (vom unlöslichen Rückstand abfiltriert mittels Schnellauftrichter und Faltenfilter) (Xi; R: 41; S: 24-26-39),
- Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$; $c(\text{Acetat}) = 0,0666 \text{ mol/L}$, $c(\text{Essigsäure}) = 0,0334 \text{ mol/L}$),
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,01 \text{ mol/L}$ in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$)).

Die beiden letztgenannten Lösungen wurden in den angegebenen Zusammensetzungen bereits für Teil a) dieses Versuchs angesetzt. Eventuell vorhandene Reste können hier weiterverwendet werden.

Geräte

Becherglas (400 mL, niedrige Form), 2 Stickstoffkolben (250 mL, NS 29), 2 Glasschliffstopfen (NS 29), Kolbenprober (100 mL) mit Dreivegehahn und passendem Halter, Kristallisierschale ($d = 14 \text{ cm}$), 2 Saugrohre ($l = 16 \text{ cm}$, $d = 1,8 \text{ cm}$) mit durchbohrten Gummistopfen (NS 14,5), 2 gewinkelte Glasrohre (1 x Schenkellängen $l_1, l_2 = 7 \text{ cm}$; 1 x Schenkellängen $l_1 = 3,5 \text{ cm}$, $l_2 = 20 \text{ cm}$), Pasteur-Pipette, pH-Meter, 2 Magnetrührer (davon einer heizbar), Kontaktthermometer, 4 Rührfische (2 x 3 cm; 2 x 4 cm Länge), Stabthermometer, 2 Aluminiumbänder (NS 29), 2 Sicherungsfedern, 2 Pulvertrichter (NS 29), 2 Haushaltssiebe ($d = 10 \text{ cm}$), PVC-Schlauch, Hebebühne, Stativmaterial, Waage, Stoppuhr, pH-Meter.

Durchführung

Die Durchführung des Versuches erfolgt mit der in Abbildung 102 dargestellten Apparatur:

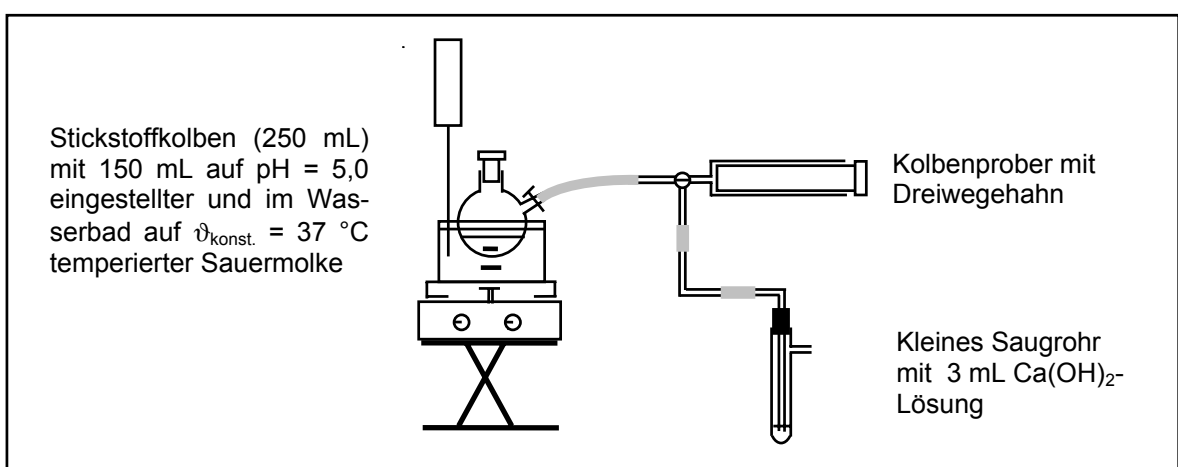


Abb. 102: Vergärung von Lactose unter Einsatz verschiedener Coimmobilisate von kovalent gebundener β -Galactosidase und Hefe in Calciumalginat-Gel.

Das Wasserbad wird zunächst unter Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) auf $\vartheta = 37 \text{ °C}$ vorgeheizt. In der Zwischenzeit passt man den pH-Wert der eingesetzten Molke dem pH-Optimum der immobilisierten β -Galactosidase an. Dazu wird ein Becherglas (400 mL, niedrige Form) mit 300 mL Sauermolke gefüllt, mit einem Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) versehen und auf dem zweiten Magnetrührer platziert. Der pH-Wert der Molke wird mit einem pH-Meter gemessen und anschließend unter Rühren mittels Magnetrührer durch tropfenweises Zufügen von Natronlauge ($c = 5 \text{ mol/L}$) auf $\text{pH} = 5,0$ gebracht.

150 mL der so vorbereiteten Molke werden nach Einstellung einer konstanten Wasserbadtemperatur in den mit einem Rührfisch ($l = 3 \text{ cm}$) ausgestatteten Stickstoffkolben (250 mL, NS 29) gefüllt und bei mäßiger Rührgeschwindigkeit auf 37 °C erwärmt (Temperaturkontrolle mittels Stabthermometer).

Zunächst wird die Gärleistung des mit guluronatreichem Natriumalginat-Sol hergestellten Coimmobilisats aus Versuchsteil a) untersucht: Dazu trennt man die Immobilisat-Kugeln mit Hilfe eines Haushaltssiebs ($d = 10 \text{ cm}$) von der Aufbewahrungsflüssigkeit ab und bringt sie anschließend unter Verwendung eines Pulvertrichters verlustfrei in den Stickstoffkolben ein. Der Kolben wird zügig mit einem Glasschliffstopfen verschlossen. Um die Dichtigkeit der Apparatur sicherzustellen, ist letzterer zusätzlich mit einer Feder zu fixieren.

Unter Ingangsetzung der Stoppuhr bringt man den Hahn des auf die Nullmarke eingestellten Kolbenprobers in die korrekte Position. Das Volumen des gebildeten Kohlenstoffdioxids wird während einer Reaktionszeit von 40 Minuten in Minutenabständen am Kolbenprober abgelesen. Der Reaktionsansatz ist dabei kontinuierlich mit mittlerer Geschwindigkeit zu rühren. Nach Abbruch der Messung wird nachgewiesen, dass es sich bei dem gebildeten Gas um Kohlenstoffdioxid handelt. Dazu leitet man nach Umschalten des Dreiwegehahns langsam 40 mL des im Kolbenprober aufgefangenen Gasgemisches in das mit 5 mL Kalkwasser gefüllte Saugrohr ein.

Während unter den genannten Bedingungen ein deutlich erkennbarer weißer Niederschlag von Calciumcarbonat entsteht, führt die Einleitung von 40 mL Luft in 5 mL Ca(OH)_2 -Lösung nur zu einer sehr schwachen Trübung. Anschließend wird die Gärleistung des mit mannuronatreichem Natriumalginat hergestellten Coimmobilisats auf analoge Weise bestimmt.

Ergebnisse

Vgl. Kapitel 2.6.3.4 des Theoretischen Teils.

Experiment 19: Vereinfachte Vergärung von Molke mit einem Coimmobilisat von Hefe und β -Galactosidase (EC 3.2.1.23)**a) Coimmobilisierung von Hefe und β -Galactosidase in Calciumalginat****Chemikalien**

Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 15 \text{ g/L}$) („Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), Trockenhefe (Firma RUF), β -Galactosidase aus Lactase-Kapseln („Enzym Lactase für eine gesunde Ernährung“, Firma Pro Natura), Calciumchlorid-Lösung ($c = 0,2 \text{ mol/L}$), entionisiertes Wasser.

Geräte

2 Bechergläser (1 x 50 mL, 1 x 100 mL), 3 Spritzen (2 x 5 mL, 1 x 10 mL; jeweils ohne Kanüle), Waage, Spatel, Glasstab, Haushaltssieb ($d = 6 \text{ cm}$), Toilettenpapier, Stativmaterial.

Durchführung

In einem 50-mL-Becherglas wird 1 g Trockenhefe eingewogen und mit 3 mL entionisiertem Wasser versetzt. Um die Hefe möglichst fein zu dispergieren, rührt man die Mischung so lange mit einem Glasstab, bis keine isolierten Trockenhefe-Partikel mehr erkennbar sind.

Zu der erhaltenen Hefe-Suspension wird dann der Inhalt einer Lactase-Kapsel gegeben. Dazu zieht man die Kapselhälften mit den Fingern auseinander, überführt den pulverförmigen Inhalt möglichst quantitativ in das Becherglas und verrührt sorgfältig mit dem Glasstab.

Die Biokatalysator-Suspension vermischt man mit 5 mL Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 15 \text{ g/L}$) und tropft die Mischung anschließend mit einer vom Stempel befreiten 10-mL-Spritze in ein 100-mL-Becherglas mit 40 mL Calciumchlorid-Lösung ($c = 0,2 \text{ mol/L}$) ein (vgl. Abbildung 103). Der Abstand zwischen Spritzenende und Flüssigkeitsoberfläche sollte dabei 3 – 4 cm betragen.

Beim Eintropfen bilden sich spontan Calciumalginat-Kugeln, die auf den Boden des Gelierba-des absinken.

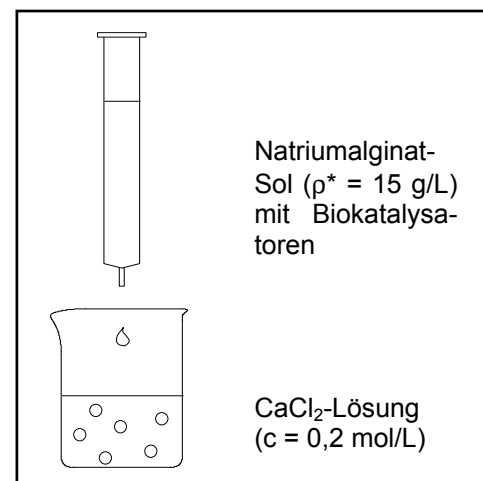


Abb. 103: Coimmobilisierung von Hefe und β -Galactosidase in Calciumalginat-Gelkugeln.

Nachdem der letzte Tropfen der hefe- und β -galactosidasehaltigen Polysaccharid-Lösung aus der Spritze ausgetreten ist, verbleiben die Coimmobilisat-Kugeln zum Aushärten noch fünf Minuten in der Calciumchlorid-Lösung. Dann werden sie mit einem Haushaltssieb abfiltriert und sorgfältig mit entionisiertem Wasser aus der Spritzflasche abgespült. Anhaftende Flüssigkeitsreste lassen sich mit einem unter das Sieb gehaltenen Stück Toilettenpapier entfernen.

b) Immobilisierung von Hefe in Calciumalginat

Chemikalien

Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 15 \text{ g/L}$) („Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), Trockenhefe (Firma RUF), Calciumchlorid-Lösung ($c = 0,2 \text{ mol/L}$), entionisiertes Wasser.

Geräte

2 Bechergläser (1 x 50 mL, 1 x 100 mL), 3 Spritzen (2 x 5 mL, 1 x 10 mL; jeweils ohne Kanüle), Waage, Spatel, Glasstab, Haushaltssieb ($d = 6 \text{ cm}$), Toilettenpapier, Stativmaterial.

Durchführung

Als Vergleichssubstanz zum Coimmobilisat wird ein Immobilisat von Hefe-Zellen in Calciumalginat ohne β -Galactosidase-Zusatz hergestellt. Dazu verrührt man in einem 50-mL-Becherglas 1 g Trockenhefe mit 3 mL entionisiertem Wasser, fügt 5 mL Natriumalginat-Sol hinzu und tropft die Mischung in ein 100-mL-Becherglas mit 40 mL Calciumchlorid-Lösung ($c = 0,2 \text{ mol/L}$) ein. Zur weiteren Vorgehensweise vgl. Versuchsteil a).

c) Gärversuche mit Molke als Substrat

Chemikalien

Coimmobilisat aus Versuchsteil a), Immobilisat aus Versuchsteil b), Molke („Bad Kissinger Kur-Molke“, Firma Milchwerke Fränkische Rhön), Filtrat einer gesättigten $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösung (vor Versuchsbeginn frisch herzustellen) (Xi; R: 41; S: 24-26-39), entionisiertes Wasser, heißes Wasser aus der Leitung.

Geräte

Becherglas (250 mL, niedrige Form), Messzylinder (25 mL), 2 Halbmikro-Reagenzgläser, 2 Präparategläser (30 mL), 2 Polyethylen-Tropfflaschen (50 mL) ohne rote Verschlusskappen, 2 Pulvertrichter (NS 14,5), 2 Plastikschräuche (Innendurchmesser: 3 mm; geeignet sind die in Apotheken relativ günstig erhältlichen Schräuche von Schwerkraft-Infusionsgeräten (z. B. „Infrafix[®] Air“, Firma Braun)), Stabthermometer, Schere, Spatel, Stativmaterial.

Durchführung

Um zu demonstrieren, dass die in Molke enthaltene Lactose mit dem Coimmobilisat aus Hefe und β -Galactosidase zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid vergoren werden kann, verwendet man die in Abbildung 104 skizzierte Versuchsanordnung:

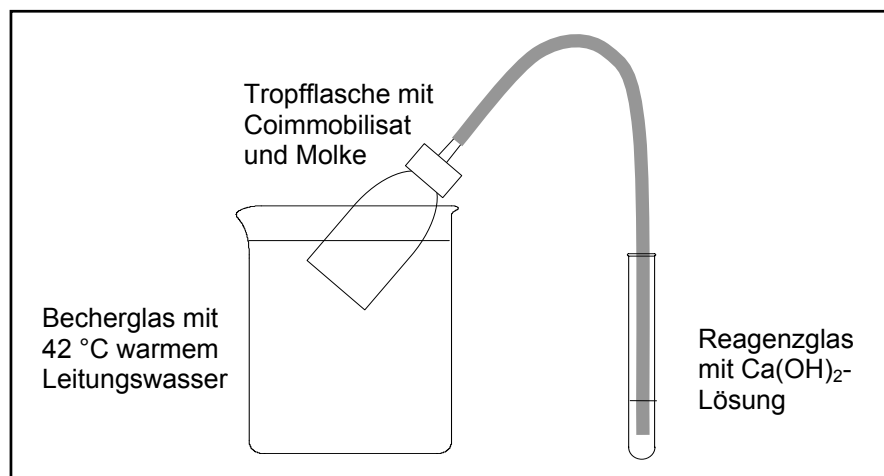


Abb. 104: Versuchsaufbau zur vereinfachten Vergärung der in Molke enthaltenen Lactose mit einem Coimmobilisat aus Hefe und β -Galactosidase.

Vor Versuchsbeginn werden die Tropfaufsätze der beiden 50-mL-Polyethylenflaschen abgeschraubt und von den roten Verschlusskappen befreit. An den mit der Schere geöffneten Spitzen der Aufsätze befestigt man nun je einen Plastikschräuch.

Unter Einsatz eines Pulvertrichters wird nun das in Versuchsteil a) hergestellte Coimmobilisat in eine der beiden 50-mL-Tropfflaschen eingefüllt und mit 20 mL Molke versetzt. Nach Aufschrauben des mit dem Plastikschräuch versehenen Tropfaufsatzes bringt man die Polyethylen-Flasche möglichst zügig in das als Temperierbad dienende 250-mL-Becherglas ein, das zuvor bis zur 200-mL-Marke mit 42 °C warmem Wasser aus der Leitung gefüllt wurde (Temperaturkontrolle mittels Stabthermometer) und startet die Stoppuhr.

Das während des Gärvorganges entstehende Kohlenstoffdioxid wird durch Einleiten in ein Halbmikroreagenzglas mit 1,5 mL Ca(OH)_2 -Lösung nachgewiesen. Um Stativmaterial einzusparen, kann man das Reagenzglas entweder in ein Präparateglas stellen oder mit Isolierband am 250-mL-Becherglas befestigen.

Zur Demonstration, dass das Hefe-Immobilisat ohne β -Galactosidase-Zusatz aus Versuchsteil b) die in Molke enthaltene Lactose nicht vergären kann, geht man auf analoge Weise vor.

In dem Ansatz mit dem Coimmobilisat aus Hefe und β -Galactosidase beginnen die Kugeln bereits nach 5 – 6 Minuten durch die einsetzende CO_2 -Bildung nach oben zu steigen. Nach einer Reaktionszeit von etwa 7 Minuten befinden sich meist alle Kugeln an der Flüssigkeitsoberfläche. Im Halbmikroreagenzglas ist nach ca. 10 Minuten eine leichte, nach 12 – 15 Minuten eine deutliche Trübung zu beobachten.

Das zum Vergleich hergestellte Hefe-Immobilisat ist hingegen nicht in der Lage, die in Molke enthaltene Lactose zu vergären. Die Kugeln steigen nicht nach oben und im Reagenzglas mit dem Kalkwasser ist keine Niederschlagsbildung festzustellen. Aus dem Schlauch treten zwar auch einige Gasblasen aus, aber dies ist lediglich darauf zurückzuführen, dass sich die im System enthaltene Luft nach Einbringen der Tropfflasche in das Temperierbad ausdehnt.

**Experiment 20: Schaumwein-Produktion mit einem Spezialimmobilisat
von Hefe in Calciumalginat-Gel**

a) Herstellung des Spezialimmobilisats

Chemikalien

Calciumchlorid (Xi; R: 36, S: 22-24), guluronatreiches Natriumalginat („Protanal LF 60“, Firma Pronova Biopolymer), mannuronatreiches Natriumalginat („Protanal LF 60-L“, Firma Pronova Biopolymer), frische Backhefe, entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- CaCl_2 -Lösung ($w = 0,01$),
- wässrige Lösung von guluronatreichem Natriumalginat ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$),
- wässrige Lösung von mannuronatreichem Natriumalginat ($\rho^* = 15 \text{ g/L}$).

Die Herstellung der beiden Natriumalginat-Sole erfolgt nach der in Experiment 2 beschriebenen Methode. Die dafür benötigten Geräte sind in der für den vorliegenden Versuch angegebenen Liste aufgeführt.

Geräte

6 Bechergläser (1 x 100 mL; 4 x 250 mL, niedrige Form; 1 x 600 mL, hohe Form), Petrischale (d = 15 cm), Rundfilter (d = 11 cm), 5 Glasstäbe, 2 Magnetrührer (davon einer heizbar), 5 Rührfische (2 x 3 cm; 3 x 4 cm Länge), Wund- und Blasenspritze (100 mL) mit Adapter (Innendurchmesser der Auslaufspitze: d = 1,5 mm), 4 Haushaltssiebe (2 x 7 cm; 2 x 10 cm Durchmesser), Stabthermometer, Stativmaterial, Waage, Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen.

Durchführung

In einem Becherglas (100 mL) werden 2,5 g frische Backhefe in 2,5 mL entionisiertem Wasser suspendiert. Unter Rühren mit einem Glasstab fügt man zu der Hefesuspension 25 mL einer wässrigen Lösung von guluronatreichem Natriumalginat ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) hinzu. Die resultierende Mischung wird unter Verwendung der vom Stempel befreiten Wund- und Blasenspritze (100 mL) in ein Becherglas (250 mL, niedrige Form) mit 150 mL CaCl_2 -Lösung ($w = 0,01$) eingetropft. Die Lösung wird dabei mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 3 \text{ cm}$) mit mäßiger Geschwindigkeit gerührt (zur Versuchsanordnung vgl. Experiment 13). Der Abstand zwischen der Spitze des Spritzenadapters und der Flüssigkeitsoberfläche sollte etwa 5 cm betragen.

Nach Zugabe des letzten Tropfens aus der Spritze lässt man die entstandenen Calciumalginat-Hefe-Kugeln 20 Minuten im mäßig gerührten Gelierbad aushärten. Anschließend wird das Immobilisat mit Hilfe eines Haushaltssiebs (d = 10 cm) von der Calciumchlorid-Lösung abgetrennt und im Unterteil einer Petrischale (d = 15 cm) portionsweise zwischen zwei Rundfiltern (d = 11 cm) trockengetupft.

Die von den anhaftenden Flüssigkeitsresten befreiten Immobilisat-Kugeln werden nun mit einer äußeren Schicht von zellfreiem Calciumalginat umhüllt. Dazu streut man die Perlen mit der Hand in ein Becherglas (600 mL, hohe Form) mit 150 mL einer wässrigen Lösung von mannuronatreichem Alginat ($\rho^* = 15 \text{ g/L}$) ein, welche mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) mit mittlerer Geschwindigkeit gerührt wird. Dabei ist darauf zu achten, dass die Immobilisat-Kugeln möglichst einzeln in das Natriumalginat-Sol eintauchen, da sich ansonsten zu große Cluster bilden.

Nach fünfzehnminütiger Reaktionszeit trennt man das Immobilisat unter Verwendung eines Haushaltssiebs (d = 10 cm) von der Natriumalginat-Lösung ab und wäscht es sorgfältig mit 1 L entionisiertem Wasser. Die gewaschenen Calciumalginat-Hefe-Kugeln werden in ein mit 150 mL CaCl_2 -Lösung ($w = 0,01$) gefülltes und mit einem Rührfisch versehenes Becherglas (250 mL, niedrige Form) eingebracht und darin unter Rühren 15 Minuten zur Aushärtung der zellfreien Calciumalginat-Schicht belassen.

Bevor die Immobilisat-Kugeln für Teil b) des Experiments verwendet werden können, sind sie nochmals in einem sauberen Haushaltssieb (d = 10 cm) mit 500 mL entionisiertem Wasser zu spülen.

b) Modellversuch zur Schaumwein-Produktion

Chemikalien

Spezialimmobilisat aus Versuchsteil a), Weißwein, Saccharose, Calciumhydroxid (**Xi**; R: 41, S: 22-24-26-39), entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- Lösung von Saccharose in Weißwein ($\rho^* = 24 \text{ g/L}$),
- Filtrat einer gesättigten Ca(OH)_2 -Lösung (**Xi**; R: 41; S: 24-26-39) (vor Versuchsbeginn frisch herzustellen).

Geräte

Becherglas (800 mL, hohe Form), kleines Saugrohr (l = 16 cm, d = 1,8 cm) mit durchbohrtem Gummistopfen (NS 14,5), großes Saugrohr (l = 20 cm, d = 2,5 cm) mit Gummistopfen (NS 24), gewinkeltes Glasrohr (Schenkellängen $l_1 = 3,5 \text{ cm}$, $l_2 = 20 \text{ cm}$), heizbarer Magnetrührer, Kontaktthermometer, Rührfisch (l = 1 cm), PVC-Schlauch, Schlauchverbindungsstück, Pulvertrichter (NS 14,5), Stativmaterial, Waage.

Durchführung

Für das Experiment wird die in Abbildung 105 skizzierte Apparatur aufgebaut:

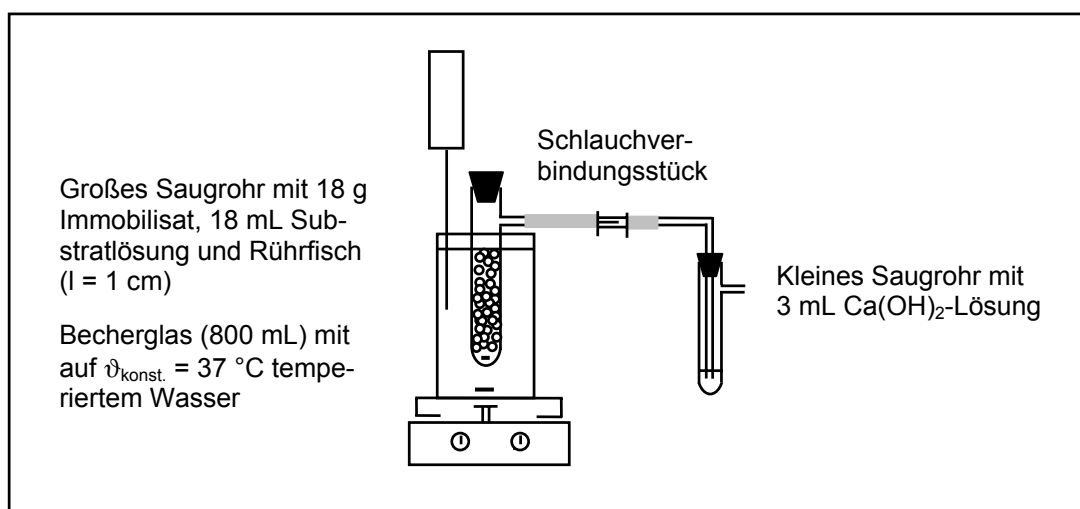


Abb. 105: Geräteanordnung für den Modellversuch zur Schaumweinproduktion mit einem Spezialimmobilisat von Hefe in Calciumalginat-Gel.

Das Wasserbad, welches aus einem mit Wasser gefüllten Becherglas (800 mL, hohe Form) besteht, wird mittels Magnetrührer und Kontaktthermometer auf $\vartheta_{\text{konst.}} = 37\text{ °C}$ erwärmt.

Sobald sich eine konstante Badtemperatur eingestellt hat, bringt man in das große Saugrohr einen Rührfisch ($l = 1\text{ cm}$) ein und füllt es anschließend mit Hilfe eines Pulvertrichters (NS 14,5) mit 18 g Immobilisat und 18 mL einer Lösung von Saccharose in Weißwein ($\rho^* = 24\text{ g/L}$).

Nach Aufsetzen des Gummistopfens und Schließen des Schlauchverbindungsstückes wird der Reaktionsansatz etwa 40 – 50 Minuten unter Rühren erwärmt. Das bei der Reaktion entstehende Gas ist, wie in Abbildung 105 dargestellt, in ein kleines Saugrohr mit 3 mL Ca(OH)_2 -Lösung einzuleiten. Meist beobachtet man schon nach einer Reaktionszeit von 30 – 35 Minuten eine leichte Trübung des Kalkwassers. Nach ca. 40 – 45 Minuten hat sich in der Regel ein deutlich erkennbarer Niederschlag von weißem Calciumcarbonat gebildet.

Experiment 21: Vereinfachte Schaumwein-Herstellung mit immobilisierter Hefe
--

a) Immobilisierung von Hefe in Calciumalginat

Chemikalien

Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 15\text{ g/L}$) („Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), Trockenhefe (Firma RUF), Calciumchlorid-Lösung ($c = 0,2\text{ mol/L}$), entionisiertes Wasser.

Geräte

2 Bechergläser (1 x 50 mL, 1 x 100 mL), 3 Spritzen (2 x 5 mL, 1 x 10 mL; jeweils ohne Kanüle), Waage, Spatel, Glasstab, Haushaltssieb ($d = 6\text{ cm}$), Toilettenpapier.

Durchführung

Für die Immobilisierung versetzt man in einem 50-mL-Becherglas 1 g Trockenhefe mit 3 mL entionisiertem Wasser. Die resultierende Mischung wird so lange mit einem Glasstab gerührt, bis die Hefe-Partikel gleichmäßig in der wässrigen Phase verteilt sind. Anschließend gibt man zu der Hefe-Suspension 5 mL Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 15 \text{ g/L}$) und durchmischt wiederum gründlich mit dem Glasstab.

Die erhaltene Hefe-Alginat-Mischung wird mit Hilfe einer vom Stempel befreiten 10-mL-Spritze in das 100-mL-Becherglas mit 40 mL Calciumchlorid-Lösung eingetroppt (zur Versuchsanordnung vgl. Experiment 13).

Die entstehenden Immobilisat-Kugeln verbleiben zur Aushärtung so lange im Gelierbad, bis sie auf den Boden abgesunken sind. Gelegentlich treten aus der Spritze luftblasenhaltige Tropfen aus, die auch nach genügend langer Aushärtezeit noch auf der Flüssigkeit aufschwimmen.

Das Calciumalginat-Hefe-Immobilisat wird anschließend unter Einsatz des Haushalts-siebes von der Calciumchlorid-Lösung abfiltriert, gründlich mit entionisiertem Wasser gespült und mit einem unter das Sieb gehaltenen Stück Toilettenpapier vorsichtig trockengetupft.

b) Modellversuch zur Schaumwein-Herstellung

Chemikalien

Hefe-Immobilisat aus Versuchsteil a), saccharosehaltige Weißwein-Lösung (2,4 g Saccharose und 50 mL Weißwein („Domkellerstolz Tafelwein, 9,5 Vol-% Alkohol“, Firma Mer-tes) mit entionisiertem Wasser auf $V = 100 \text{ mL}$ auffüllen), Filtrat einer gesättigten Calciumhydroxid-Lösung (**Xi**; R: 41; S: 24-26-39) (vor Versuchsbeginn frisch herzustellen), heißes Wasser aus der Leitung.

Geräte

Weithalslerlenmeyerkolben (300 mL), Stabthermometer, Messzylinder (25 oder 50 mL), Reagenzglas ($l = 16 \text{ cm}$, $d = 1,6 \text{ cm}$), durchbohrter Gummistopfen mit kleinem Gärrohr, Spritze (1 mL), Pulvertrichter (NS 14,5), Haushaltssieb ($d = 6 \text{ cm}$), Becherglas (100 mL).

Durchführung

Der Versuch wird mit der in Abbildung 106 skizzierten Geräteanordnung durchgeführt:

Man füllt zunächst das Reagenzglas mit 15 mL saccharosehaltiger Weißwein-Lösung und temperiert diese im Wasserbad auf mindestens 37 °C. Dazu wird der mit 40 – 42 °C warmem Leitungswasser gefüllte Erlenmeyerkolben verwendet. Die Temperaturkontrolle führt man jeweils mit dem Stabthermometer durch.

Sobald die Weißwein-Lösung die gewünschte Temperatur erreicht hat, fügt man mittels Pulvertrichter das Hefe-Immobilisat hinzu und setzt den Gummistopfen mit dem Gärröhr auf, das zuvor mit 1 mL des Filtrates einer gesättigten Calciumhydroxid-Lösung gefüllt wurde (vgl. Abbildung 106).

Die Veränderungen in der immobilisat-haltigen Weißwein-Lösung und im Gärröhr sind zu beobachten: Nach einer Reaktionszeit von etwa fünf Minuten beginnen die Immobilisat-Kugeln durch die im Rahmen des Gärvorganges einsetzende Kohlenstoffdioxid-Entwicklung zur Flüssigkeitsoberfläche aufzusteigen. Nach ca. zehn Minuten ist in dem Gärröhr eine deutliche weiße Trübung zu erkennen.

Am Ende der Reaktion wird das Hefe-Immobilisat mit Hilfe eines Haushaltssiebes vom Reaktionsgemisch abgetrennt. Die als Filtrat erhaltene kohlenstoffdioxid- und alkoholhaltige Lösung (= Schaumwein) fängt man in einem 100-mL-Becherglas auf; sie enthält praktisch keine Hefe-Trübung.

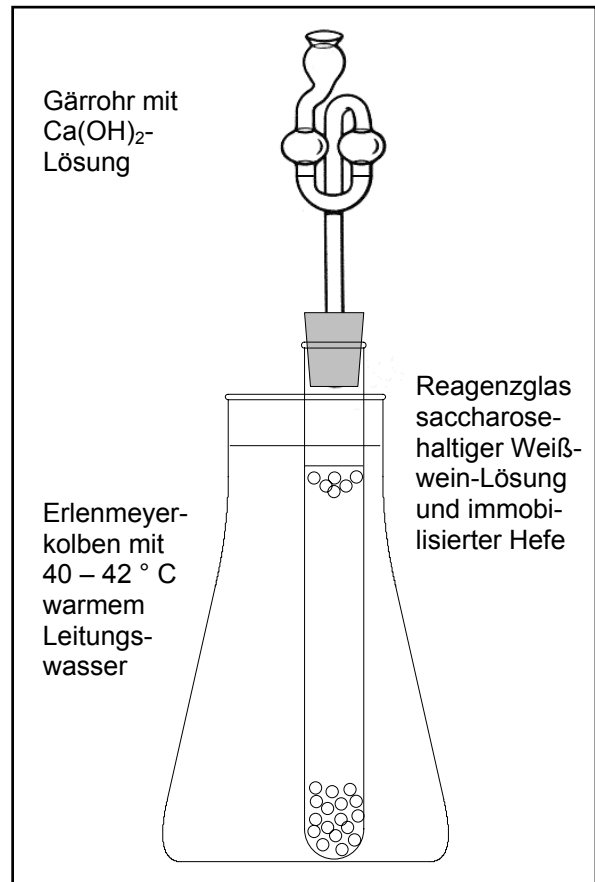


Abb. 106: Vereinfachte Schaumwein-Herstellung von Schaumwein Immobilisaten von Hefe in Calciumalginat.

Experiment 22: Enzymatische Spaltung von Lactose in Milch mit einem Immobilisat von kovalent an Alginat gebundener β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*) (EC 3.2.1.23) in Calciumalginat-Gel

a) Kovalente Bindung von β -Galactosidase an Alginat und Herstellung von Calciumalginat-Immobilisaten

Chemikalien

Natriumacetat-Trihydrat, konzentrierte Essigsäure ($w = 1$) (C; R: 10-35, S: 23.2-26-45), Calciumchlorid-Dihydrat (Xi; R: 36, S: 22-24), guluronatreiches Natriumalginat (z. B. „Protanal LF 60“, Firma Pronova Biopolymer), N-Hydroxysuccinimid, N-(3-Dimethyl-amino-propyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) (Xi; R: 6/37/38, S: 26-36), β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*), entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH = 5,0; c (Acetat) = 0,0666 mol/L, c (Essigsäure) = 0,0334 mol/L),
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,1$ mol/L in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH = 5,0)),
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,01$ mol/L in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH = 5,0)),
- Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 50$ g/L),
- Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 33,33$ g/L).

Zur Herstellung der beiden Algenpolysaccharid-Lösungen vgl. Durchführung.

Geräte

Bechergläser (2 x 25 mL, 1 x 50 mL, 1 x 100 mL, 1 x 250 mL, breite Form; 1 x 600 mL, hohe Form), 2 Erlenmeyerschiffkolben (50 mL, NS 29), 2 Glasschliffstopfen (NS 29), 2 Vollpipetten (5 mL), 7 Glasstäbe, 2 Magnetrührer (davon einer heizbar), 2 Rührfische (2 x 3 cm, dicke Form; 1 x 4 cm, 1 x 5 cm), Wund- und Blasenspritze (100 mL) mit Adapter (Innendurchmesser der Auslaufspitze: $d = 1,5$ mm), Haushaltssiebe (1 x 7 cm; 1 x 10 cm), Gummiwischer, 2 Sicherungsfedern, 2 Aluminiumbänder (NS 29), Stabthermometer, Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen, Spatel, Stativmaterial, Stoppuhr, Waage, Kühlschrank.

Durchführung

Für das Experiment sind zunächst zwei unterschiedlich konzentrierte Lösungen eines guluronatreichen Alginates anzusetzen:

20 mL der konzentrierteren Algenpolysaccharid-Lösung ($\rho^* = 50 \text{ g/L}$) werden in einem Becherglas (50 mL) mit Rührfisch ($l = 3 \text{ cm}$) nach der in Experiment 18 a) beschriebenen Methode hergestellt. Von dem Sol mit niedrigerem Alginat-Gehalt ($\rho^* = 33,33 \text{ g/L}$) sind 50 mL in einem Becherglas (250 mL, niedrige Form) mit Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) anzusetzen. Dabei geht man auf die übliche Weise vor (vgl. Experiment 2).

Die kovalente Bindung von β -Galactosidase an Alginat erfolgt in Analogie zu der Arbeitsvorschrift, die bereits in Experiment 18 a) für die Coimmobilisierung von Hefe-Zellen und Enzym beschrieben wurde:

In einen mit Rührfisch ($l = 5 \text{ cm}$) ausgestatteten Erlenmeyerschiffkolben (50 mL, NS 29), werden zunächst 10 g Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 50 \text{ g/L}$) eingewogen.

In einem Becherglas (25 mL) löst man nun 0,160 g N-Hydroxysuccinimid und 0,140 g N-(3-Dimethyl-aminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) in 5 mL entionisiertem Wasser. Eine gründliche Durchmischung der Lösung wird durch Rühren mit einem Glasstab sichergestellt. Die Lösung wird anschließend möglichst vollständig in den Erlenmeyerschiffkolben mit Natriumalginat-Sol überführt. Die erhaltene Mischung lässt man 15 Minuten bei mittlerer Rührgeschwindigkeit reagieren.

Währenddessen werden in einem Becherglas (25 mL) 0,250 mg β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*) unter Rühren mit einem Glasstab in 5 mL entionisiertem Wasser gelöst. Die wässrige Enzym-Lösung fügt man unter Verwendung eines Gummiwischers möglichst verlustfrei zum Reaktionsgemisch im Erlenmeyerschiffkolben hinzu. Nach zweiminütiger Rührzeit wird der Kolben mit einem Glasschliffstopfen (NS 29) verschlossen, mit einer Feder gesichert und zur kovalenten Bindung der β -Galactosidase an die Alginat-Matrix mindestens 20 Stunden Kühlschrank aufbewahrt. Den Rührfisch ($l = 5 \text{ cm}$) belässt man dabei im Kolben.

Nach etwa zwanzigstündiger Reaktionszeit im Kühlschrank wird der Ansatz wie folgt weiterverarbeitet: In ein Becherglas (100 mL) mit 30 g Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 33,33 \text{ g/L}$) bringt man 25 mL Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$) und rührt sorgfältig mit einem Glasstab. Die hergestellte Mischung wird möglichst rückstandslos zu dem im Erlenmeyerkolben befindlichen Ansatz gegeben. Um eine gute Durchmischung zu gewährleisten, rührt man den Kolbeninhalt drei Minuten mittels Magnetrührer.

Der Inhalt des Erlenmeyerkolbens wird anschließend unter Verwendung einer mit Adapter versehenen Wund- und Blasenspritze (100 mL) in ein Becherglas (600 mL, hohe Form) mit 250 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,1 \text{ mol/L}$ in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$)) eingetropft (zur Versuchsanordnung vgl. Experiment 13). Die Lösung ist dabei mit-

tels Magnetrührer und Rührfisch (l = 3 cm, dicke Form) mit mittlerer Geschwindigkeit zu rühren. Der Abstand zwischen Adapterausgang und Flüssigkeitsoberfläche sollte etwa 4 cm betragen.

Nach Zugabe des letzten Tropfens aus der Spritze lässt man die enzymhaltigen Calciumalginat-Kugeln drei Stunden in der mäßig gerührten Lösung aushärten. Das Immobilisat wird anschließend unter Einsatz eines Haushaltssiebes (d = 10 cm) von der Gelierlösung abgetrennt und mit 200 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung (c = 0,01 mol/L in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH = 5,0)) gespült.

Die gewaschenen Immobilisat-Kugeln werden in einen Erlenmeyerschiffkolben (50 mL, NS 29) überführt und in 50 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung (c = 0,01 mol/L in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH = 5,0)) suspendiert. Den mit einem Glasschliffstopfen (NS 29) verschlossenen und mit einer Feder gesicherten Kolben bewahrt man im Kühlschrank auf.

b) Verwendung des Enzym-Immobilisates für die hydrolytische Spaltung von Lactose in H-Milch

Chemikalien

β -Galactosidase-Immobilisat aus Versuchsteil a), H-Milch (Fettgehalt: 1,5 %), Glucose-Teststreifen mit den Enzymen Glucoseoxidase (GOD) und Peroxidase (POD) sowie 3,3',5,5'-Tetramethylbiphenyl-4,4'-diamin (TMB) als Farbstoff (z. B. „Ratio-Test“, Firma Boehringer Mannheim), Natriumacetat-Trihydrat, konzentrierte Essigsäure (w = 1) (C; R: 10-35, S: 23.2-26-45), Calciumchlorid-Dihydrat (Xi; R: 36, S: 22-24), entionisiertes Wasser, Glaswolle.

Anzusetzende Lösungen

- Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH = 5,0; c (Acetat) = 0,0666 mol/L, c (Essigsäure) = 0,0334 mol/L),
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung (c = 0,01 mol/L in Natriumacetat/Essigsäure-Puffer (pH = 5,0)).

Lösungen der angegebenen Zusammensetzungen wurden bereits für Teil a) dieses Experimentes hergestellt und können weiterverwandt werden.

Geräte

2 Weithalserlenmeyerkolben (50 mL), Ionenaustauschersäule (l = 24 cm, d = 2,5 cm), langer Glasstab, PVC-Schlauch (l = 8 cm), Quetschhahn nach Mohr, Haushaltssieb (d = 10 cm), Stativmaterial, Waage, Stoppuhr.

Durchführung

In einen Weithalslerlenmeyerkolben (50 mL) werden 30 mL H-Milch (Fettgehalt: 1,5 %) gefüllt. Mit Hilfe eines Teststreifens ist unter Beachtung der vom Hersteller angegebenen Gebrauchsanleitung zunächst die Glucose-Freiheit der H-Milch nachzuweisen. Im Falle des für das vorliegende Experiment verwendeten „Ratio-Tests“ wird dabei wie folgt verfahren: Man taucht einen Teststreifen kurz in den mit Milch gefüllten Kolben ein und streift beim Herausziehen dessen seitliche Kante am Gefäßrand ab. Eine innerhalb von zwei Minuten auftretende grüne Verfärbung des vorher gelben Testbezirktes zeigt die Anwesenheit von Glucose an.

Für die enzymatische Spaltung der in der H-Milch enthaltenen Lactose trennt man zunächst unter Verwendung des Haushaltssiebes ($d = 10 \text{ cm}$) die in Versuchsteil a) hergestellten enzymhaltigen Calciumalginat-Kugeln von der Aufbewahrungsflüssigkeit ab.

In die mit einem Glaswolle-Pfropfen versehene und mittels PVC-Schlauch und Quetschhahn verschlossene Ionenaustauschersäule bringt man unter Zuhilfenahme eines Pulvertrichters (NS 14,5) 30 g des Enzym-Immobilisates sowie eine 30-mL-Portion H-Milch. Nach einer Reaktionszeit von zehn Minuten lässt man durch Öffnen des Quetschhahnes die in der Säule enthaltene Milch in den zweiten Weithalslerlenmeyerkolben (50 mL) ab und prüft mit einem Teststreifen auf Glucose. Man beobachtet innerhalb des zulässigen zeitlichen Rahmens eine grüne Verfärbung des Testfeldes, durch welche Glucose spezifisch nachgewiesen wird.

Das Enzym-Immobilisat ist nach Versuchsende aus der Ionenaustauschersäule in das Haushaltssieb ($d = 10 \text{ cm}$) zu überführen und sorgfältig mit 200 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,01 \text{ mol/L}$ in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$)) zu spülen. Die Aufbewahrung bis zur Wiederverwendung erfolgt wie in Versuchsteil a) beschrieben.

Experiment 23: Photometrische Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten von nicht immobilisierter und immobilisierter β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*) (EC 3.2.1.23)

a) Kovalente Bindung von β -Galactosidase an Alginat und Herstellung von Calciumalginat-Immobilisaten

Chemikalien

Natriumacetat-Trihydrat, konzentrierte Essigsäure ($w = 1$) (C; R: 10-35, S: 23.2-26-45), Calciumchlorid-Dihydrat (Xi; R: 36, S: 22-24), guluronatreiches Natriumalginat („Protanal LF 60“, Firma Pronova Biopolymer), mannuronatreiches Natriumalginat („Protanal LF 60-L“, Firma Pronova Biopolymer), N-Hydroxysuccinimid, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) (Xi; R: 36/37/38, S: 26-36), β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*), entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH = 5,0; c (Acetat) = 0,0666 mol/L, c (Essigsäure) = 0,0334 mol/L),
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,1$ mol/L in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH = 5,0)),
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,01$ mol/L in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH = 5,0)),
- guluronatreiches Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 50$ g/L),
- mannuronatreiches Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 50$ g/L),
- guluronatreiches Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 26,66$ g/L).

Zur Vorgehensweise bei der Herstellung der drei Natriumalginat-Lösungen vgl. Versuchsdurchführung.

Geräte

11 Bechergläser (4 x 25 mL; 2 x 50 mL; 2 x 100 mL; 1 x 250 mL, niedrige Form; 2 x 600 mL, hohe Form), 4 Erlenmeyerschiffkolben (100 mL, NS 29), 4 Glasschliffstopfen (NS 29), Vollpipette (5 mL), 10 Glasstäbe, 3 Magnetrührer (davon einer heizbar), Rührfische (2 x 3 cm, dicke Form; 3 x 4 cm; 2 x 5 cm), 2 Wund- und Blasenspritzen (100 mL) mit Adapter (Innendurchmesser der Auslaufspitze: $d = 1,5$ mm), 2 Haushaltssiebe (1 x 7 cm; 2 x 10 cm Durchmesser), 4 Gummiwischer, 4 Pulvertrichter (NS 29), 4 Sicherungsfedern, 4 Aluminiumbänder (NS 29), Stabthermometer, Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen, Spatel, Stativmaterial, Stoppuhr, Waage, Kühlschrank.

Durchführung

Für das Experiment benötigt man unterschiedlich konzentrierte wässrige Lösungen von guluronat- und mannuronatreichen Natriumalginaten. Von den GG- und MM-reichen Algenpolysaccharid-Solen ($\rho^* = 50 \text{ g/L}$) werden jeweils 20 mL in 50-mL-Bechergläsern mit Rührfischen ($l = 3 \text{ cm}$) angesetzt. Dabei verfährt man gemäß der in Experiment 18 a) beschriebenen Arbeitsvorschrift. 100 mL der niedriger konzentrierten Lösung des guluronatreichen Natriumalginats werden auf die übliche Weise in einem 250-mL-Becherglas (niedrige Form) mit Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) hergestellt (zur Vorgehensweise vgl. Experiment 2). Die photometrische Aktivitätsbestimmung soll mit zwei Immobilisaten von kovalent an Alginat gebundener β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*) durchgeführt werden. Wie Tabelle 67 verdeutlicht, bringt man im ersten Ansatz 0,250 g β -Galactosidase mit 10 g guluronatreichem Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 50 \text{ g/L}$) zur Reaktion. Dabei werden als Kupplungsreagenzien N-Hydroxysuccinimid und N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) verwendet. Im zweiten Ansatz wird das Enzym hingegen kovalent an Natriumalginat mit hohem Mannuronat-Gehalt gebunden. Dabei verfährt man gemäß der in Experiment 22 a) beschriebenen Arbeitsvorschrift.

Tab. 67: Ansatzgrößen für die kovalente Bindung von β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*) an guluronat- und mannuronatreiches Natriumalginat.

Komponenten	Ansatz 1	Ansatz 2
Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 50 \text{ g/L}$)		
GG-reich („Protanal LF 20/60“)	10 g	–
MM-reich („Protanal LF 20/60-L“)	–	10 g
Kupplungsreagenzien	0,160 g N-Hydroxysuccinimid und 0,140 g EDC in 5 mL entionisiertem Wasser	0,160 g N-Hydroxysuccinimid und 0,140 g EDC in 5 mL entionisiertem Wasser
β -Galactosidase	0,250 g in 5 mL entionisiertem Wasser	0,250 g in 5 mL entionisiertem Wasser

Nach 20- bis 24-stündiger Reaktionszeit im Kühlschrank versetzt man jeden der beiden Ansätze mit einer im 100-mL-Becherglas hergestellten Mischung aus 30 g Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 26,66 \text{ g/L}$) und 25 mL Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$). Um eine gute Durchmischung zu gewährleisten, rührt man den Kolbeninhalt drei Minuten mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 5 \text{ cm}$).

Der Inhalt jedes Erlenmeyerkolbens wird anschließend unter Verwendung einer mit Adapter versehenen Wund- und Blasenspritze (100 mL) in ein Becherglas (600 mL, hohe Form) mit 250 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,1 \text{ mol/L}$ in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$)) eingetropft (zur Versuchsanordnung vgl. Experiment 13). Die beiden Geliebäder sind dabei jeweils mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 3 \text{ cm}$, dicke Form) mit

mittlerer Geschwindigkeit zu rühren. Der Abstand zwischen Adapterausgang und Flüssigkeitsoberfläche sollte etwa 4 cm betragen.

Nach Zugabe des letzten Tropfens aus der Spritze lässt man die enzymhaltigen Calciumalginat-Kugeln drei Stunden in der mäßig gerührten Lösung aushärten. Die erhaltenen Immobilisate werden dann mit Hilfe von Haushaltssieben ($d = 10 \text{ cm}$) von den Gelierbädern abgetrennt und mit 200 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,01 \text{ mol/L}$ in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$)) gespült.

Zur Aufbewahrung überführt man die Immobilisat-Ansätze dann in zwei Erlenmeyerschlickkolben (50 mL, NS 29) und überschichtet mit je 50 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,01 \text{ mol/L}$ in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$)). Die mit Glasschliffstopfen (NS 29) verschlossenen und mit Federn gesicherten Kolben werden bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

b) Kurzzeitmessung zur Bestimmung der relativen enzymatischen Aktivitäten der hergestellten Immobilisate

Chemikalien

Immobilisate aus Versuchsteil a), Natriumacetat-Trihydrat, konzentrierte Essigsäure ($w = 1$) (**C**; R: 10-35, S: 23.2-26-45), 2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG), β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*), Natriumcarbonat (**Xi**; R: 36; S: 2-2-26), entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$; c (Acetat) = $0,0666 \text{ mol/L}$, c (Essigsäure) = $0,0334 \text{ mol/L}$),
- 2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid-Lösung ($\rho^* = 3,7 \text{ g/L}$) in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$),
- Na_2CO_3 -Lösung ($w = 0,1$),
- β -Galactosidase-Lösungen:

Zunächst wird eine wässrige β -Galactosidase-Lösung ($\rho^* = 0,6 \text{ mg/mL}$) angesetzt. Diese dient als Stammlösung für eine Verdünnungsreihe von Enzym-Lösungen, die man für die Erstellung der Kalibriergeraden benötigt.

Für die Herstellung der Konzentrationsreihe werden jeweils die in der zweiten Spalte von Tabelle 68 angegebenen Volumina der Stammlösung mit Hilfe von Vollpipetten in Messkolben (100 mL) gegeben und mit entionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 mL aufgefüllt. Dabei ist für eine gute Durchmischung der Lösungen zu sorgen.

Tab. 68: Herstellung der β -Galactosidase-Lösungen für die Konzentrationsreihe.

β -Galactosidase-Lösung	V (Stammlösung) in mL	mg Enzym pro mL Lösung
E 1	1	0,006
E 2	2	0,012
E 3	3	0,018
E 4	4	0,024
E 5	5	0,030

Geräte

7 Vollpipetten (1 x 1 mL, 1 x 2 mL, 1 x 3 mL, 3 x 4 mL, 1 x 5 mL), 14 Pasteur-Pipetten, Eppendorf-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen, 19 Messkolben (14 x 50 mL, 5 x 100 mL), 2 heizbare Magnetrührer mit Kontaktthermometern, 2 Kristallisierschalen (d = 14 cm), 16 Rührfische (14 x 1 cm; 2 x 5 cm), 14 Erlenmeyerkolben (25 mL) mit passenden Gummistopfen, 2 Haushaltssiebe (d = 10 cm), Handphotometer mit Filter ($\lambda = 405$ nm).

Durchführung

Das Ziel des Versuches besteht darin, die enzymatische Aktivität der in Versuchsteil a) hergestellten β -Galactosidase-Immobilisate mit der Umsatzleistung von gelöst vorliegendem Enzym zu vergleichen. Dazu ermittelt man durch eine photometrische Bestimmung, in welchem Maße das als Substrat eingesetzte 2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) enzymatisch in 2-Nitrophenol und D-Galactose gespalten wird.

Für die Erstellung einer Kalibriergeraden werden am Anfang des Experimentes die enzymatischen Aktivitäten der in Tabelle 68 aufgeführten fünf β -Galactosidase-Lösungen (E 1 – E 5; $\rho^* = 0,006 - 0,030$ mg/L) in einem Reaktionszeitraum von 30 Minuten bei $\vartheta = 37$ °C untersucht. Die prinzipielle Vorgehensweise für jede Messung ist dabei folgende:

Man stellt zunächst zwei Erlenmeyerkolben (25 mL) mit Rührfischen (l = 1 cm) und passenden Gummistopfen bereit. In den ersten Kolben werden 4 mL ONPG-Lösung und in den zweiten 4 mL Essigsäure-Acetat-Puffer pipettiert. Für das Abmessen der Volumina sind die entsprechenden Vollpipetten zu verwenden.

Die Erlenmeyerkolben verschließt man dann mit Gummistopfen und temperiert sie zehn Minuten unter Rühren in zwei zuvor auf $\vartheta = 37$ °C vorgeheizten Wasserbädern, die aus heizbaren Magnetrührern, Kontaktthermometern und mit entionisiertem Wasser gefüllten Kristallisierschalen (d = 14 cm) mit Rührfischen (l = 5 cm) bestehen.

Zu der erwärmten ONPG-Lösung wird dann unter Einsatz einer Eppendorf-Pipette 1 mL der jeweils zu untersuchenden β -Galactosidase-Lösung hinzugefügt. Dabei startet man die Stoppuhr jeweils nach vollständiger Entleerung der Pipette.

Ungefähr 60 Sekunden später wird auch der als Vergleichsprobe dienende Natriumacetat-Essigsäure-Puffer mit 1 mL enzymhaltiger Lösung versetzt. Die Zeit, nach der die Pipette völlig entleert ist, muss jeweils notiert werden.

Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten wird aus dem substrathaltigen Reaktionsansatz mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette 1 mL entnommen und in einen Messkolben (50 mL) pipettiert, der 1 mL Natriumcarbonat-Lösung ($w = 0,01$) (Eppendorf-Pipette!) zum Abstoppen der Reaktion enthält. Nach Aufsetzen des Stopfens mischt man durch Schütteln gründlich durch.

Mit der entsprechenden zeitlichen Versetzung pipettiert man mittels Eppendorf-Pipette auch eine 1-mL-Probe aus der als Vergleichsprobe fungierenden Reaktionsmischung in einen mit 1 mL Natriumcarbonat-Lösung ($w = 0,01$) versehenen Messkolben und verfährt weiter wie im Falle der ONPG-Lösung.

Die beiden 50-mL-Messkolben füllt man daraufhin jeweils mit entionisiertem Wasser bis zur Eichmarke auf und sorgt durch Schütteln für eine gründliche Vermischung der Inhalte. Geeignete Volumina der in den Messkolben enthaltenen Lösungen werden mit Hilfe von Pasteur-Pipetten in Quarzküvetten (Schichtdicke: $l = 1$ cm) pipettiert. Anschließend bestimmt man mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm die Extinktions-Differenz zwischen dem Reaktionsansatz mit Substrat-Lösung und dem mit Puffer-Lösung (Blindprobe).

Das Absorptionsmaximum des bei der enzymatischen Spaltung aus ONPG entstehenden 2-Nitrophenols liegt eigentlich bei $\lambda_{\max} = 420$ nm (Hartmeier 1986, S. 162). Da das verwendete Handphotometer aber nicht über einen Filter mit der entsprechenden Wellenlänge verfügt, misst man die Extinktions-Differenz näherungsweise bei $\lambda = 405$ nm.

Um den aus der minimalen Eigenzersetzung von ONPG resultierenden Fehler zu berücksichtigen, wird auf die zuvor beschriebene Weise auch eine Nullpunkt-Messung durchgeführt, bei der man nach jeweils 30-minütiger Temperierung die Extinktions-Differenz zwischen einem Ansatz mit 4 mL ONPG-Lösung und 1 mL entionisiertem Wasser und einer Probe mit 4 mL Natriumacetat-Essigsäure-Puffer und 1 mL entionisiertem Wasser ermittelt.

Zur Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivitäten der beiden Immobilisat-Ansätze aus Versuchsteil a) geht man dann folgendermaßen vor:

Unter Einsatz von Haushaltssieben ($d = 10 \text{ cm}$) werden die Calciumalginat-Kugeln jeweils von der Aufbewahrungsflüssigkeit abgetrennt. Nach Abtropfen der Flüssigkeitsreste bestimmt man durch Wägung die Gesamtmassen der beiden Immobilisat-Ansätze. Diese Werte sind erforderlich, damit über das Gewicht der für die photometrische Bestimmung eingesetzten einzelnen Immobilisat-Kugel deren theoretischer Enzym-Gehalt berechnet werden kann.

Die Untersuchung der β -Galactosidase-Aktivität der Immobilisat-Kugeln erfolgt prinzipiell in Analogie zur Erstellung der Kalibriergeraden mit löslichem Enzym:

In zwei mit Rührfischen ($l = 1 \text{ cm}$) versehenen und mit Stopfen verschlossenen Erlenmeyerkolben (25 mL) werden 4 mL ONPG-Lösung bzw. 4 mL Natriumacetat-Essigsäure-Puffer zehn Minuten unter Rühren im auf $\vartheta = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgeheizten Wasserbad temperiert. In den Kolben mit der Substrat-Lösung pipettiert man zunächst mittels Eppendorf-Pipette 1 mL entionisiertes Wasser und setzt nach Zugabe einer zuvor abgewogenen Immobilisat-Kugel die Stoppuhr in Gang. Der Wasser-Zusatz hat die Funktion, die Gesamtvolumina der Reaktionsansätze vergleichbar mit denen bei der Erstellung der Kalibriergeraden zu machen. Nicht berücksichtigt wird dabei das – allerdings sehr geringe – Eigenvolumen der im Gemisch enthaltenen Immobilisat-Kugel.

Mit einer Zeitversetzung von 60 Sekunden wird auch die als Vergleichsprobe fungierende Puffer-Lösung mit 1 mL entionisiertem Wasser sowie einer Immobilisat-Kugel mit gleicher Masse versetzt. Die Zeit, zu der sich die Kugel in der Lösung befindet, ist wiederum der Startpunkt der Reaktion.

Wie bei der Erstellung der Kalibriergeraden werden dann nach Reaktionszeiten von jeweils 30 Minuten zeitversetzt 1-mL-Proben aus den Ansätzen entnommen und in 50-mL-Messkolben mit 1 mL Natriumcarbonat-Lösung ($w = 0,1$) zum Abstoppen der Reaktion gegeben. Nach Auffüllen auf ein Gesamtvolumen von 50 mL und gründlicher Durchmischung wird photometrisch die Extinktions-Differenz zwischen dem Reaktionsansatz mit ONPG-Lösung und der Vergleichsprobe mit Puffer-Lösung photometrisch bestimmt. Die Messung erfolgt wiederum unter Einsatz von Quarzküvetten (Schichtdicke: $l = 1 \text{ cm}$) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$.

Ergebnisse

In drei Messreihen zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden für nicht immobilisierte β -Galactosidase nach der zuvor beschriebenen photometrischen Methode die in Tabelle 69 aufgeführten Extinktions-Differenzen ermittelt:

Tab. 69: Kalibriergeraden: Extinktions-Differenzen in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge löslicher β -Galactosidase (Substrat: ONPG, Reaktionszeit: 30 min, $\lambda = 405$ nm).

mg Enzym	ΔE		
	Messreihe 1	Messreihe 2	Messreihe 3
0	0,005	0,013	0,015
0,006	0,064	0,052	0,044 ^a
0,012	0,100	0,098	0,102
0,018	0,154	0,166	0,152
0,024	0,187	0,195	0,191
0,030	0,217	0,236	0,214

^a Reaktionszeit: 31 min.

Für die β -Galactosidase-Immobilisate, bei denen das Enzym kovalent an guluronat- bzw. mannuronatreiches Natriumalginat gebunden wurde (= Ansätze 1 und 2) ergab die photometrische Bestimmung die in Tabelle 70 angegebenen ΔE -Werte:

Tab. 70: Photometrische Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten von zwei verschiedenen β -Galactosidase-Immobilisaten (Reaktionszeit: 30 min, $\lambda = 405$ nm).

Kenndaten des Immobilisates	Reaktionsansatz 1: Kopplung an GG-reiches Alginat			Reaktionsansatz 2: Kopplung an MM-reiches Alginat		
	Mes- sung 1	Mes- sung 2	Mes- sung 3	Mes- sung 1	Mes- sung 2	Mes- sung 3
	Alter in d	3	4	8	3	4
Gesamtmasse in g	46,535	46,535	46,535	46,964	46,964	46,964
Theoretischer Gesamtgehalt an Enzym in mg	250	250	250	250	250	250
Masse der eingesetzten Kugel in mg	17	17	17	17	17	17
Theoretischer Enzym-Gehalt pro Kugel in mg ^a	0,091	0,091	0,091	0,090	0,090	0,090
ΔE	0,052	0,042	0,033	0,069	0,050	0,046

^a Berechnung: $\frac{m(\text{Enzym}_{\text{gesamt}}) \cdot m(\text{Immobilisat-Kugel})}{m(\text{Immobilisat}_{\text{gesamt}})}$

Durch graphisches Auftragen der ermittelten Extinktions-Differenzen in Abhängigkeit von der im Reaktionsansatz vorhandenen Masse an löslichem Enzym lassen sich für die drei Messreihen zur Aktivität von nicht immobilisierter β -Galactosidase die in Abbildung 107 a) – c) dargestellten Kalibriergeraden ermitteln. Angegeben werden jeweils auch die zugehörige Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß ($= R^2$) der Messung.

Aus den für die Immobilisat-Kugeln gemessenen Extinktions-Differenzen kann man nun graphisch bzw. unter Zugrundelegung der Geradengleichungen die Masse an löslichem Enzym ermitteln, die für das Erreichen dieses ΔE -Wertes hätte vorliegen müssen.

Wird diese Masse dann ins Verhältnis zu der theoretisch in der Immobilisat-Kugel vorliegenden Enzym-Menge (vgl. Tabelle 70), gesetzt, so kann man für die beiden Reaktionsansätze mit immobilisierter β -Galactosidase relative Aktivitäten im Vergleich zum löslichen Enzym berechnen. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 71 zusammengestellt.

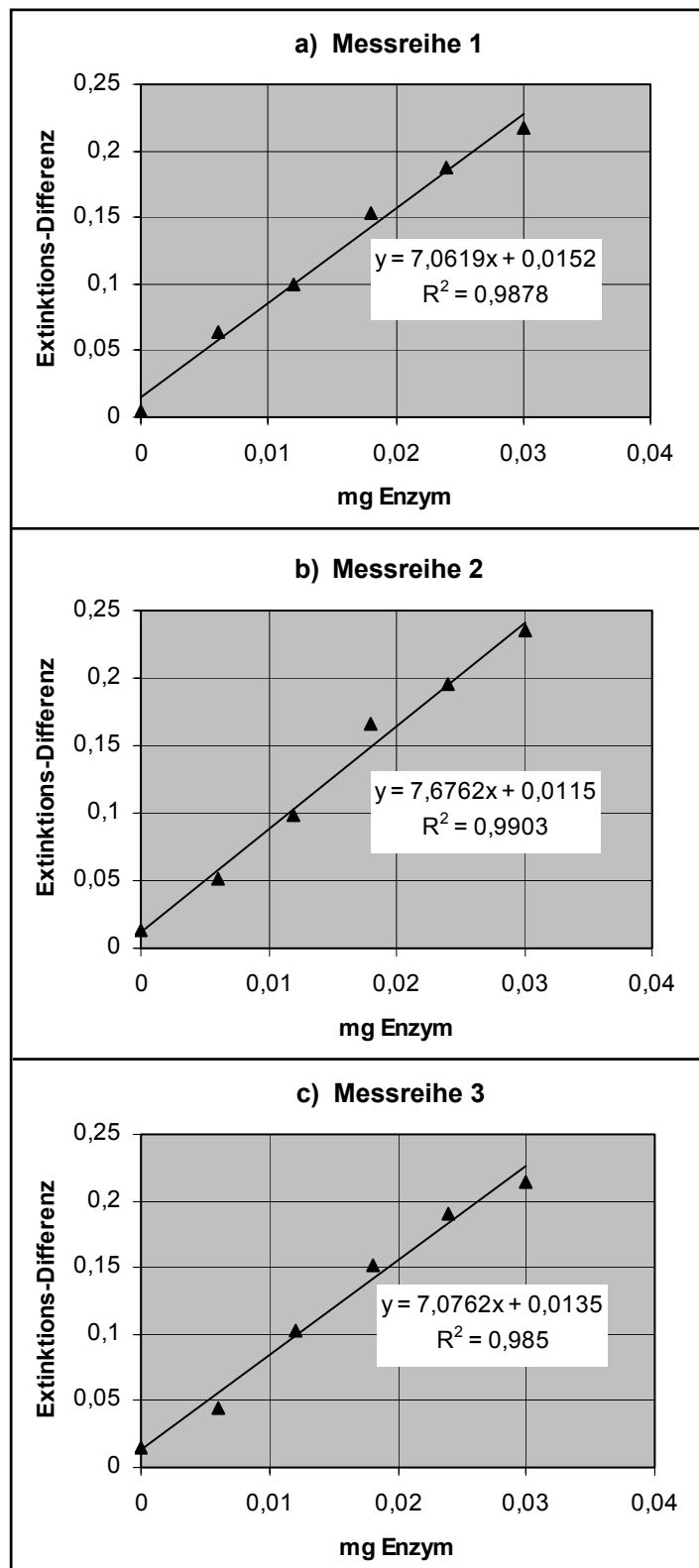


Abb. 107: Kurzzeitmessung: Kalibriergeraden für die photometrische Bestimmung der enzymatischen Aktivität gelöster und immobilisierter β -Galactosidase.

Tab. 71: Berechnung der relativen Aktivitäten der hergestellten β -Galactosidase-Immobilisate im Vergleich zur äquivalenten Menge löslichen Enzyms.

Kenndaten des Immobilisates	Reaktionsansatz 1: Kopplung an GG-reiches Alginat			Reaktionsansatz 2: Kopplung an MM-reiches Alginat		
	Mes- sung 1	Mes- sung 2	Mes- sung 3	Mes- sung 1	Mes- sung 2	Mes- sung 3
Alter in d	3	4	8	3	4	8
ΔE	0,052	0,042	0,033	0,069	0,050	0,046
Theoretischer Enzym-Gehalt pro Kugel in mg	0,091	0,091	0,091	0,090	0,090	0,090
Über ΔE aus Kalibriergeraden ermittelter Enzym-Gehalt x pro Kugel in mg						
Messreihe 1: $x = \frac{(\Delta E - 0,0152)}{7,0619}$	0,0052	0,0037	0,0025	0,0076	0,0049	0,0044
Messreihe 2: $x = \frac{(\Delta E - 0,0115)}{7,6762}$	0,0053	0,0040	0,0028	0,0075	0,0050	0,0045
Messreihe 3: $x = \frac{(\Delta E - 0,0135)}{7,0762}$	0,0054	0,0040	0,0028	0,0078	0,0052	0,0046
Durchschnitt aus Messreihe 1 – 3	0,0053	0,0039	0,0027	0,0076	0,0050	0,0045
Relative Aktivität der Immobilisat-Kugel im Vergleich zur äquivalenten Menge löslicher β -Galactosidase in Prozent ^a	5,8	4,3	3,0	8,4	5,6	5,0

^a Berechnung: $\frac{\text{Experimentell bestimmter Durchschnittswert aus Messreihe 1 – 3 in mg}}{\text{Theoretischer Enzym-Gehalt pro Kugel in mg}}$

c) Langzeitmessung zur Bestimmung der relativen enzymatischen Aktivitäten der hergestellten Immobilisate

Chemikalien

Natriumacetat-Trihydrat, konzentrierte Essigsäure ($w = 1$) (C; R: 10-35, S: 23.2-26-45), 2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG), β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*), Natriumcarbonat (Xi; R: 36; S: 2-2-26), entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$; $c(\text{Acetat}) = 0,0666 \text{ mol/L}$, $c(\text{Essigsäure}) = 0,0334 \text{ mol/L}$),
- 2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid-Lösung ($\rho^* = 3,7 \text{ g/L}$) in Natriumacetat-Essigsäure-Puffer ($\text{pH} = 5,0$),
- Na_2CO_3 -Lösung ($w = 0,1$),
- β -Galactosidase-Lösungen:

Als Stammlösung wird eine wässrige β -Galactosidase-Lösung ($\rho^* = 0,6 \text{ mg/mL}$) hergestellt. Aus dieser Lösung setzt man eine Verdünnungsreihe an, die dann bei der Erstellung der Kalibrierkurven zum Einsatz kommt.

Zur Erstellung der Konzentrationsreihe pipettiert man mit den entsprechenden Vollpipetten jeweils die in Tabelle 72 angegebenen Volumina der Stammlösung in 100-mL-Messkolben, füllt mit entionisiertem Wasser bis zur Eichmarke aus und durchmischt gründlich.

Tab. 72: Für die Kalibrierkurven anzusetzende Verdünnungsreihe von β -Galactosidase-Lösungen.

β -Galactosidase-Lösung	V (Stammlösung) in mL	mg Enzym pro mL Lösung
E 1	1	0,006
E 2	2	0,012
E 3	3	0,018
E 4	4	0,024
E 5	5	0,030

Geräte

7 Vollpipetten (1 x 1 mL, 1 x 2 mL, 1 x 3 mL, 3 x 4 mL, 1 x 5 mL), 14 Pasteur-Pipetten, Eppendorf-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen, 19 Messkolben (100 mL), 14 Präparategläser (30 mL), 2 Haushaltssiebe ($d = 10$ cm), Handphotometer mit Filter ($\lambda = 405$ nm).

Durchführung

Die Langzeitbestimmung zum Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von immobilisierter und nicht immobilisierter β -Galactosidase erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie die Kurzzeitmessung. Da der Reaktionszeitraum 17 Stunden beträgt, wird allerdings aus Gründen der Einfachheit auf eine Temperierung und Durchmischung der Proben mittels Magnetrührer verzichtet. Als Reaktionsgefäße werden anstelle von 25-mL-Erlenmeyerkolben verschließbare Präparategläser (30 mL) verwendet.

Für die Erstellung der Kalibrierkurven benötigt man 12 Präparategläser, von denen die Hälfte mit je 4 mL ONPG-Lösung (Analysen) und die restlichen mit demselben Volumen Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (Vergleichsproben) gefüllt werden.

Nun setzt man gemäß den Angaben in Tabelle 73 auf die im Folgenden beschriebene Weise die Reaktionsmischungen für die jeweiligen Messungen an. Die Zeitangaben sind nur Richtwerte, die sich bei mehrmaliger Durchführung als günstig für eine bequeme Bearbeitung der Proben erwiesen haben. Wichtig ist es lediglich, die zeitliche Versetzung so zu wählen, dass pro Ansatz eine Reaktionszeit von 17 Stunden eingehalten wird.

Für die Messungen E 0 – E 5 pipettiert man mit der Eppendorf-Pipette 1 mL entionisiertes Wasser bzw. die entsprechende der jeweiligen β -Galactosidase-Lösung (E 1 – E 5) in ein Präparateglas mit 4 mL ONPG-Lösung und startet nach vollständiger Zugabe die Stoppuhr. Etwa eine Minute später wird auch der als Vergleichsprobe dienende Natriumacetat-Essigsäure-Puffer mit demselben Volumen entionisierten Wassers versetzt. Die Zeit, nach der die Pipette völlig entleert ist, ist zu notieren.

Nach einer Reaktionszeit von 17 Stunden entnimmt man aus jedem ONPG-haltigen Reaktionsansatz 1 mL mittels Eppendorf-Pipette und pipettiert die Flüssigkeit in einen Messkolben (100 mL), der 1 mL Natriumcarbonat-Lösung ($w = 0,01$) zum Abstoppen der Reaktion enthält. Nach Aufsetzen des Stopfens wird durch Schütteln gründlich gemischt.

Mit der entsprechenden zeitlichen Versetzung entnimmt man auch aus der als Vergleichsprobe fungierenden Reaktionsmischung eine 1-mL-Probe mittels Eppendorf-Pipette, gibt diese in einen zweiten 100-mL-Messkolben mit 1 mL Natriumcarbonat-Lösung ($w = 0,01$) und verfährt weiter wie im Falle der ONPG-Lösung.

Die beiden 100-mL-Messkolben werden dann jeweils mit entionisiertem Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt und sorgfältig durchmischt.

Tab. 73: Reaktionsansätze für die photometrische Langzeitmessung der enzymatischen Aktivität löslicher β -Galactosidase (Erstellung der Kalibrierkurve).

Messpaar	Zeit in min	Komponenten im jeweiligen Reaktionsansatz							
		ONPG-Lösung	Puffer-Lösung	Ention. H ₂ O	β -Galactosidase-Lösungen (Konzentrationsreihe)				
					E 1	E 2	E 3	E 4	E 5
E 0 ^a									
Analyse	0	4 mL	–	1 mL	–	–	–	–	–
Vergleichsprobe	1	–	4 mL	1 mL	–	–	–	–	–
E 1									
Analyse	6	4 mL	–	–	1 mL	–	–	–	–
Vergleichsprobe	7	–	4 mL	–	1 mL	–	–	–	–
E 2									
Analyse	12	4 mL	–	–	–	1 mL	–	–	–
Vergleichsprobe	13	–	4 mL	–	–	1 mL	–	–	–
E 3									
Analyse	18	4 mL	–	–	–	–	1 mL	–	–
Vergleichsprobe	19	–	4 mL	–	–	–	1 mL	–	–
E 4									
Analyse	24	4 mL	–	–	–	–	–	1 mL	–
Vergleichsprobe	25	–	4 mL	–	–	–	–	1 mL	–
E 5									
Analyse	30	4 mL	–	–	–	–	–	–	1 mL
Vergleichsprobe	31	–	4 mL	–	–	–	–	–	1 mL

^a Für die Messung E 0 wird anstelle von β -Galactosidase-Lösung lediglich entionisiertes Wasser zur Analyse bzw. Vergleichslösung hinzugesetzt. Damit wird das Ziel verfolgt, die aus der minimalen Eigenzersetzung von ONPG resultierende 2-Nitrophenol-Konzentration zu ermitteln.

Für die photometrische Bestimmung der 2-Nitrophenol-Konzentration werden geeignete Volumina der in den 100-mL-Messkolben enthaltenen Lösungen unter Einsatz von Pasteur-Pipetten in Quarzküvetten (Schichtdicke: $l = 1$ cm) überführt. Anschließend bestimmt man mit dem Handphotometer die Extinktions-Differenz zwischen dem Reaktionsansatz mit Substrat-Lösung und der als Blindprobe dienenden Puffer-Lösung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm (vgl. auch Versuchsteil b)).

Nach Erstellung der Kalibrierkurve bestimmt man im zweiten Teil des Experimentes die β -Galactose-Aktivitäten der beiden Immobilisat-Ansätze aus Versuchsteil a). Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Unter Einsatz von Haushaltssieben ($d = 10$ cm) werden die Calciumalginat-Kugeln jeweils von der Aufbewahrungsflüssigkeit abgetrennt. Nach Abtropfen der Flüssigkeitsreste bestimmt man durch Wägung die Gesamtmassen der beiden Immobilisat-Ansätze. Diese Werte sind erforderlich, damit über das Gewicht der für die photometrische Bestimmung eingesetzten einzelnen Immobilisat-Kugel deren theoretischer Enzym-Gehalt berechnet werden kann.

Die Untersuchung der β -Galactosidase-Aktivität der Immobilisat-Kugeln erfolgt prinzipiell in Analogie zu den Messungen für die Erstellung der Kalibrierkurve:

In ein Präparateglas mit 4 mL ONPG-Lösung pipettiert man zunächst mittels Eppendorf-Pipette 1 mL entionisiertes Wasser und setzt nach Zugabe einer zuvor abgewogenen Immobilisat-Kugel die Stoppuhr in Gang. Der Wasser-Zusatz hat die Funktion, die Gesamtvolumina der Reaktionsansätze vergleichbar mit denen bei der Erstellung der Kalibrierkurve zu machen. Nicht berücksichtigt wird dabei das – allerdings sehr geringe – Eigenvolumen der im Gemisch enthaltenen Immobilisat-Kugel.

Mit einer Zeitversetzung von etwa einer Minute wird auch die als Vergleichsprobe fungierende Puffer-Lösung mit 1 mL entionisiertem Wasser sowie einer Immobilisat-Kugel mit gleicher Masse versetzt. Die Zeit, zu der sich die Kugel in der Lösung befindet, ist wiederum der Startpunkt der Reaktion.

Nach einer Reaktionszeit von 17 Stunden werden dann zeitversetzt 1-mL-Proben aus den Ansätzen entnommen und in 100-mL-Messkolben mit 1 mL Natriumcarbonat-Lösung ($w = 0,1$) zum Abstoppen der Reaktion gegeben. Nach Auffüllen auf ein Gesamtvolumen von 100 mL und gründlicher Durchmischung bestimmt man photometrisch die Extinktions-Differenz zwischen dem Reaktionsansatz mit ONPG-Lösung und der Vergleichsprobe mit Puffer-Lösung. Die Messung wird wiederum unter Einsatz von Quarzküvetten (Schichtdicke: $l = 1$ cm) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm vorgenommen.

Ergebnisse

Tabelle 74 zeigt die Ergebnisse von drei Messreihen zur Erstellung der Kalibrierkurven. Angegeben sind jeweils die Extinktions-Differenzen, die nach der zuvor beschriebenen photometrischen Methode für die Messpaare E 0 – E 5 ermittelt wurden:

Tab. 74: Kalibrierkurven: Extinktions-Differenzen in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge löslicher β -Galactosidase (Substrat: ONPG, Reaktionszeit: 17 h, $\lambda = 405$ nm).

Messpaar	mg Enzym	ΔE		
		Messreihe 1	Messreihe 2	Messreihe 3
E 0	0	0,006	0,006 ^a	0,006 ^a
E 1	0,006	0,215	0,206	0,209
E 2	0,012	0,320	0,332	0,308
E 3	0,018	0,377	0,375	0,389
E 4	0,024	0,398	0,395	0,391
E 5	0,030	0,386	0,408	0,386

^a Die Bestimmung des ΔE -Wertes für das Messpaar E 0 erfolgte nur einmal, da alle Messreihen in kurzen zeitlichen Abständen mit derselben ONPG-Lösung durchgeführt wurden.

Trägt man die photometrisch ermittelten Extinktions-Differenzen in Abhängigkeit von der im Reaktionsansatz vorhandenen Masse an löslichem Enzym graphisch auf, so ergeben sich die drei in Abbildung 108 a) – c) dargestellten Kalibrierkurven.

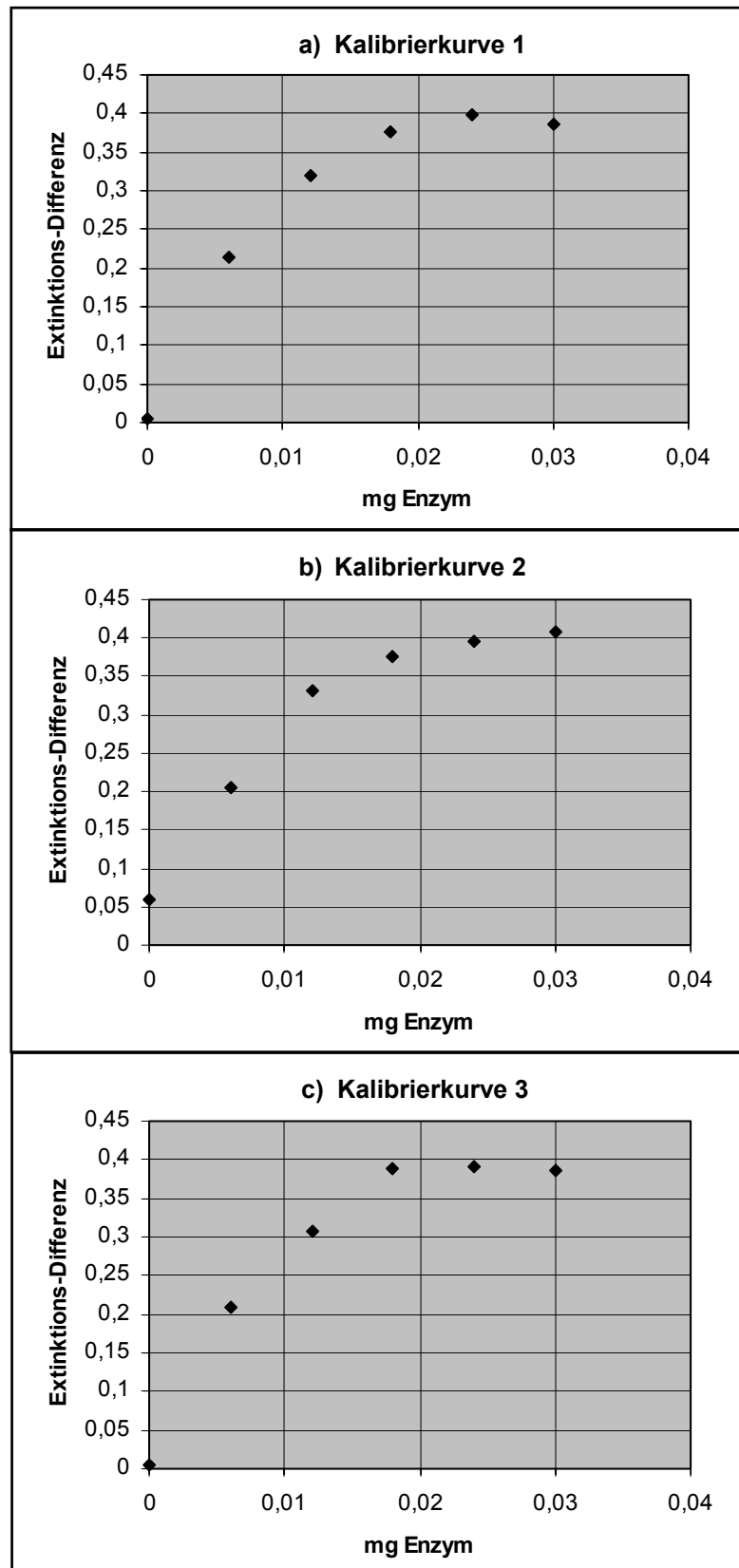


Abb. 108: Langzeitmessung: Kalibrierkurven für die photometrische Bestimmung der enzymatischen Aktivität gelöster und immobilisierter β -Galactosidase.

Für die β -Galactosidase-Immobilisate, bei denen das Enzym kovalent an Natriumalginat mit hohem Guluronat- bzw. Mannuronat-Gehalt gekoppelt wurde (= Ansätze 1 und 2), ergab die photometrische Bestimmung die in Tabelle 75 aufgeführten ΔE -Werte.

Tab. 75: Photometrische Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten von zwei verschiedenen β -Galactosidase-Immobilisaten (Reaktionszeit: 17 h, $\lambda = 405$ nm).

Kenndaten des Immobilisates	Reaktionsansatz 1: Kopplung an GG-reiches Alginat			Reaktionsansatz 2: Kopplung an MM-reiches Alginat		
	Mes- sung 1	Mes- sung 2	Mes- sung 3	Mes- sung 1	Mes- sung 2	Mes- sung 3
Alter in d	1	1	1	1	1	1
Gesamtmasse in g	50,861	50,861	50,861	46,22	46,122	46,122
Theoretischer Gesamtgehalt an Enzym in mg	250	250	250	250	250	250
Masse der eingesetzten Kugel in mg	36 ^a	40 ^a	36 ^a	17	17	18
Theoretischer Enzym-Gehalt pro Kugel in mg ^b	0,177	0,197	0,177	0,092	0,092	0,098
ΔE	0,363	0,378	0,361	0,291	0,249	0,302
Über ΔE aus Kalibrierkurven graphisch ermittelter Enzym-Gehalt x pro Kugel in mg						
Messreihe 1	0,0163	0,0187	0,0161	0,0099	0,0076	0,0106
Messreihe 2	0,0152	0,0183	0,0150	0,0096	0,0076	0,0102
Messreihe 3	0,0157	0,0184	0,0154	0,0095	0,0076	0,0102
Durchschnitt aus Messreihe 1 – 3	0,0157	0,0185	0,0155	0,0097	0,0076	0,0103
Relative Aktivität der Immobilisat-Kugel im Vergleich zur äquivalenten Menge löslicher β -Galactosidase in Prozent ^c	8,9	9,4	8,8	10,5	8,3	10,5

^a Die eingesetzte Wund- und Blasenspritze verfügte über einen Adapter mit einem vom Normwert abweichendem Innendurchmesser.

^b Berechnung: $\frac{m(\text{Enzym}_{\text{gesamt}}) \cdot m(\text{Immobilisat-Kugel})}{m(\text{Immobilisat}_{\text{gesamt}})}$

^c Berechnung: $\frac{\text{Experimentell bestimmter Durchschnittswert aus Messreihe 1 – 3 in mg}}{\text{Theoretischer Enzym-Gehalt pro Kugel in mg}}$

Aus den für die Immobilisat-Kugeln gemessenen Extinktions-Differenzen kann nun graphisch die Masse an löslichem Enzym ermittelt werden, die für das Erreichen dieses ΔE -Wertes hätte vorliegen müssen. Wird diese Masse dann durch die theoretisch in der Immobilisat-Kugel vorliegende Enzym-Menge dividiert, so lassen sich für die beiden Reaktionsansätze mit immobilisierter β -Galactosidase relative Aktivitäten im Vergleich zum löslichen Enzym berechnen. Die entsprechenden Werte sind ebenfalls in Tabelle 74 zusammengestellt.

Experiment 24: Vereinfachte Lactose-Spaltung mit in Calciumalginat-Gel immobilisierter β -Galactosidase (EC 3.2.1.23)

a) Immobilisierung von β -Galactosidase in Calciumalginat-Kugeln

Chemikalien

Natriumalginat-Lösung („Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238) ($\rho^* = 15 \text{ g/L}$) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), β -Galactosidase-Kapseln („Enzym Lactase für eine gesunde Ernährung“, Firma Pro Natura), Calciumchlorid-Lösung ($c = 0,2 \text{ mol/L}$), entionisiertes Wasser.

Geräte

2 Spritzen (10 mL, ohne Kanüle), 3 Bechergläser (1 x 50 mL; 2 x 100 mL), Glasstab, Haushaltssieb ($d = 6 \text{ cm}$), Toilettenpapier.

Durchführung

Mit der Spritze werden 10 mL Natriumalginat-Sol abgemessen, in das 50-mL-Becherglas gefüllt und mit dem Inhalt einer β -Galactosidase-Kapsel versetzt. Dazu zieht man die Kapselhälften mit den Fingern auseinander, überführt den pulverförmigen Inhalt möglichst quantitativ in das Becherglas und verrührt sorgfältig mit dem Glasstab, bis die Enzym-Partikel gleichmäßig dispergiert sind.

Die erhaltene Suspension wird anschließend unter Einsatz der vom Stempel befreiten 10-mL-Spritze in das mit 40 mL Calciumchlorid-Lösung gefüllte 100-mL-Becherglas eingetropfelt (zur Versuchsanordnung vgl. Experiment 19).

Da die Tropfgeschwindigkeit der in der Spritze befindlichen Mischung mit sinkendem Flüssigkeitsstand abnimmt, ist es ratsam, dass Austreten der letzten Tropfen durch leichtes Klopfen auf die Spritze zu beschleunigen.

Etwa 10 Minuten nach Immobilisierungsbeginn sind die Calciumalginat- β -Galactosidase-Kugeln so weit ausgehärtet, dass sie auf den Boden des Becherglases absinken. Eventuell schwimmen noch einige luftblasenhaltige Partikel auf der Flüssigkeitsoberfläche.

Unter Einsatz eines Haushaltssiebes ($d = 6$ cm) trennt man das Immobilisat vom Gelierbad ab. Dabei wird das Filtrat in einem Becherglas (100 mL) aufgefangen und für Versuchsteil c) aufbewahrt.

Die im Sieb befindlichen β -Galactosidase-Calciumalginat-Kugeln spült man gründlich mit entionisiertem Wasser aus der Spritzflasche ab und tupft sie vorsichtig mit einem unter das Sieb gehaltenen Stück Toilettenpapier trocken. Sie werden für die Teile b) bzw. d) dieses Experimentes benötigt.

b) Verwendung von β -Galactosidase-Immobilisaten für die Spaltung der in H-Milch und Molke enthaltenen Lactose

Chemikalien

Immobilisat von β -Galactosidase in Calciumalginat aus Teil a) des Experimentes, H-Milch („Schwälbchen Haltbare Vollmilch“, Fettgehalt mindestens 3,8 %, Firma Schwälbchen), Molke („Bad Kissinger Kur-Molke“, Fettgehalt maximal 0,1 %, Milchwerke Fränkische Rhön), Glucose-Teststäbchen für halbquantitativen Nachweis („Diabur-Test[®] 5000 Glucose“, Firma Roche Diagnostics), entionisiertes Wasser.

Geräte

Spritze (20 mL; ohne Stempel und Kanüle), Plastikschlauch (Innendurchmesser: 3 mm; geeignet sind die in Apotheken relativ günstig erhältlichen Schläuche von Schwerkraft-Infusionsgeräten (z. B. „Infracix[®] Air“, Firma Braun)), Quetschhahn, Pulvertrichter (NS 14,5), Messzylinder (25 mL), Weithalslerlenmeyerkolben (50 mL), Haushaltssieb ($d = 6$ cm), Toilettenpapier. Stoppuhr.

Durchführung

Vor Beginn der enzymatischen Lactose-Spaltung werden die milchzuckerhaltigen Substrat-Lösungen (H-Milch und Molke) auf Glucose-Freiheit überprüft. Die Nachweisreaktionen müssen in beiden Fällen negativ ausfallen, d. h. nach zwei Minuten darf sich keine Grünfärbung des Glucose-Testfeldes eingestellt haben.

Als Modellreaktor für die Lactose-Hydrolyse dient die in Abbildung 109 skizzierte Apparatur: An dem Auslauf einer vom Stempel befreiten 20-mL-Spritze wird ein etwa 5 cm langes Schlauchstück angebracht und mit einem Quetschhahn verschlossen.

In die Spritze bringt man einen Glaswolle-Pfropfen ein, befüllt sie unter Einsatz des Pulvertrichters mit dem β -Galactosidase-Immobilisat aus Versuchsteil a) und fügt pro Versuchsansatz 10 mL H-Milch oder Molke hinzu.

Nach Reaktionszeiten von 5, 10 und 15 Minuten wird unter Öffnen des Quetschhahnes jeweils die gesamte Reaktionslösung aus der Spritze in den Weithalslerlenmeyerkolben entlassen, mit einem Teststäbchen auf ihren Glucose-Gehalt untersucht und zur Fortführung der

Reaktion wieder in die Spritze mit den Immobilisat-Kugeln eingebracht. Das Ergebnis des Glucose-Tests wird jeweils nach 2 Minuten ab-

gelesen (Vergleich mit der Farbskala auf dem Teststreifen-Behälter). Falls weder H-Milch noch Molke vorhanden sind, kann das Experiment auch mit 10 mL Lactose-Monohydrat-Lösung ($p^* = 52,6 \text{ g/L}$) durchgeführt werden, deren Lactose-Gehalt größenordnungsmäßig dem von Kuhmilch entspricht (Falbe/Regitz 1995 d, S. 2789).

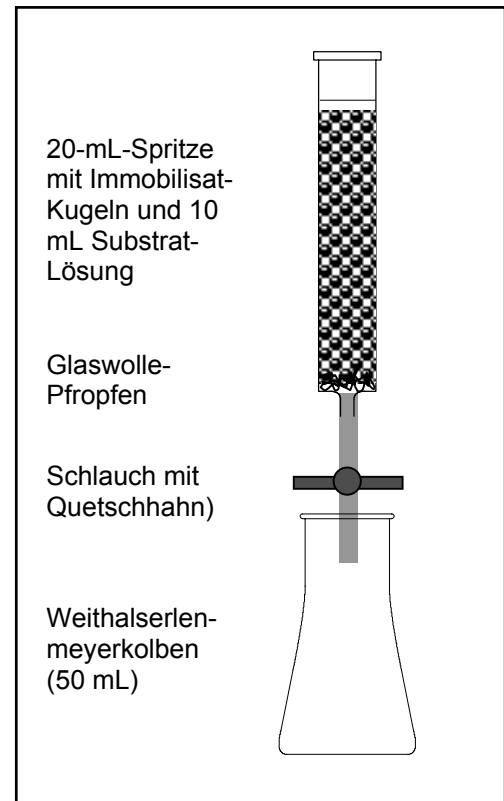


Abb. 109: Versuchsaufbau für die vereinfachte Lactose-Hydrolyse in H-Milch und Molke mit in Calciumalginat immobilisierter β -Galactosidase.

Ergebnisse

Typische Ergebnisse des halbquantitativen Versuches zur Hydrolyse von Lactose in Milch und Molke unter Einsatz von β -Galactosidase-Calciumalginat-Immobilisaten werden in Tabelle 76 wiedergegeben:

Tab. 76: Enzymatische Lactose-Spaltung mit immobilisierter β -Galactosidase.

t in min	Glucose-Gehalt in g/100 mL ^a		
	H-Milch	Molke	Lactose-Lösung
0	0	0	0
5	knapp 0,1	0,25 – 0,5	0,1 – 0,25
10	0,10 – 0,25	0,5 – 1	0,25 – 0,5
15	0,25 – 0,5	1 – 2	0,25 – 0,5

^a Den verschiedenfarbigen Feldern auf der Farbskala der Packung mit Glucose-Teststreifen sind jeweils die in der Tabelle angegebenen Konzentrationsbereiche zugeordnet.

c) Überprüfung der Vollständigkeit der Immobilisierung von β -Galactosidase in Calciumalginat-Gel

Chemikalien

Gelierbad der β -Galactosidase-Immobilisierung aus Versuchsteil a), Lactose-Monohydrat, Glucose-Teststäbchen für halbquantitativen Nachweis („Diabur-Test[®] 5000 Glucose“, Firma Roche Diagnostics).

Geräte

Becherglas (50 mL), Spritze (10 mL), Glasstab, Spatel, Waage, Stoppuhr.

Durchführung

Um die Vollständigkeit der Enzym-Rückhaltung in den Calciumalginat-Kugeln zu überprüfen, wird das abgetrennte Gelierbad des Immobilisierungsversuches (Experiment 24 a)) auf die Anwesenheit von β -Galactosidase untersucht.

Dazu wiegt man in ein 50-mL-Becherglas 0,526 g Lactose-Monohydrat ein und versetzt das Disaccharid mit 10 mL Gelierbad (Abmessen mittels Spritze!). Nach Starten der Stoppuhr wird so lange mit einem Glasstab gerührt, bis sich der Zucker vollständig gelöst hat.

Nach Reaktionszeiten von 5, 10 und 15 Minuten überprüft man jeweils den Glucose-Gehalt der Mischung mit Hilfe von halbquantitativen Teststäbchen.

Ergebnisse

Wie die Werte in Tabelle 77 zeigen, findet auch im Gelierbad in geringem Umfang die enzymatische Spaltung von Lactose in ihre beiden Monosaccharid-Komponenten statt:

Tab. 77: Überprüfung des Gelierbades aus dem Immobilisierungsversuch (Experiment 24 a)) auf β -Galactosidase-Aktivität.

t in min	Glucose-Gehalt im Gelierbad in g/100 mL ^a
5	0
10	0
15	0 – 0,1

^a Den verschiedenfarbigen Feldern auf der Farbskala der Packung mit Glucose-Teststreifen sind jeweils die in der Tabelle angegebenen Konzentrationsbereiche zugeordnet.

Daraus lässt sich schließen, dass die β -Galactosidase bei der Immobilisierung nicht vollständig in das Calciumalginat-Gel eingeschlossen wird, sondern teilweise in die zum Gelieren verwandte Calciumchlorid-Lösung diffundiert. Da allerdings die im Gelierbad gefundenen Glucose-Konzentrationen wesentlich niedriger liegen als in den Versuchsansätzen zur Lactose-Hydrolyse mit den Calciumalginat- β -Galactosidase-Kugeln, kann man davon ausgehen, dass die Enzym-Verluste bei der Immobilisierung relativ gering sind.

d) Vergleich der Hydrolyse-Aktivitäten nicht immobilisierter und in Calciumalginat-Gel immobilisierter β -Galactosidase

Chemikalien

Immobilisat von β -Galactosidase in Calciumalginat aus Versuchsteil a), β -Galactosidase-Kapseln („Enzym Lactase für eine gesunde Ernährung“, Firma Pro Natura), Lactose-Monohydrat-Lösung ($\rho^* = 52,6$ g/L), Glucose-Teststäbchen für halbquantitativen Nachweis („Diabur-Test[®] 5000 Glucose“, Firma Roche Diagnostics).

Geräte

3 Bechergläser (2 x 50 mL, 1 x 100 mL), Spritze (10 mL, ohne Kanüle), Glasstab, 2 Reagenzgläser (l = 16 cm, d = 1,6 cm), Reagenzglasständer, Glastrichter (d = 3 cm), Faltenfilter (d = 7 cm), Haushaltssieb (d = 6 cm), Stoppuhr.

Durchführung

Vor Versuchsbeginn muss zunächst mit Glucose-Teststäbchen überprüft werden, ob die Lactose-Lösung glucosefrei ist. Der Glucose-Nachweis ist negativ, wenn sich die Farbe der beiden Testfelder auf dem Stäbchen nach zwei Minuten nicht verändert hat.

Für die Untersuchung der enzymatischen Aktivität nicht immobilisierter β -Galactosidase füllt man zunächst ein 50-mL-Becherglas mit 10 mL Lactose-Lösung, fügt möglichst quantitativ den Inhalt einer β -Galactosidase-Kapsel hinzu, setzt die Stoppuhr in Gang und verrührt die Mischung gründlich mit einem Glasstab, bis die β -Galactosidase-Partikel gleichmäßig verteilt sind.

Nach 5, 10 und 15 Minuten wird der Glucose-Gehalt des Reaktionsansatzes jeweils mit einem Teststäbchen untersucht. Die Auswertung des Glucose-Tests erfolgt nach 2 Minuten durch Farbvergleich mit der Skala auf dem Teststreifen-Behälter.

Die lactosespaltende Wirkung des gespülten und getrockneten β -Galactosidase-Immobilisates aus Versuchsteil a) wird anschließend auf analoge Weise untersucht. Dazu füllt man die Immobilisat-Kugeln in ein Becherglas und versetzt mit 10 mL Lactose-Lösung. Nach Reaktionszeiten von 5, 10 und 15 Minuten wird dann jeweils auf die oben beschriebene Weise der Glucose-Gehalt des Gemisches mit einem Teststäbchen überprüft.

Zum Abschluss des Experimentes soll die Abtrennbarkeit der nicht immobilisierten und in Calciumalginat-Gel eingeschlossenen β -Galactosidase von der Reaktionsmischung getestet werden:

Dazu filtriert man zunächst den Ansatz mit freier β -Galactosidase mittels Glastrichter ($d = 3$ cm) und Faltenfilter ($d = 7$ cm) in ein Reagenzglas ab.

Zur Abtrennung der Immobilisat-Kugeln kommt ein Haushaltssieb ($d = 6$ cm) zum Einsatz. Das erhaltene Filtrat wird in einem Becherglas (100 mL) aufgefangen und anschließend in ein Reagenzglas überführt. Die Filtrate des Reaktionsansatzes mit nicht immobilisiertem und immobilisiertem Enzym sind zu vergleichen.

Ergebnisse

In Tabelle 78 sind typische Ergebnisse des Experimentes zusammengestellt. Wie ersichtlich, ist die lactosespaltende Aktivität der freien β -Galactosidase deutlich höher als die des in Calciumalginat-Kugeln immobilisierten Enzyms.

Das liegt zum einen darin begründet, dass die Gelmatrix eine Diffusionsbarriere für das Substrat und die Spaltprodukte des enzymatischen Hydrolyseprozesses darstellt, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit verringert wird.

Eine weitere Ursache für die niedrigere lactosespaltende Aktivität des Immobilisates kann darin bestehen, dass bei dem Matrixeinschluss von β -Galactosidase in Calciumalginat-

Gel ein Teil des Enzyms nicht gebunden wird, sondern im Gelierbad in Lösung geht (vgl. Versuchsteil c)).

Tab. 78: Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von nicht immobilisierter und in Calciumalginat-Gel eingeschlossener β -Galactosidase.

t/min	Glucose-Gehalt in g/100 mL ^a	
	Ansatz mit nicht immobilisierter β -Galactosidase	Ansatz mit in Calciumalginat immobilisierter β -Galactosidase
5	1	0,25
10	1 – 2	0,25 – 0,5
15	knapp 2	knapp 0,5

^a Den verschiedenfarbigen Feldern auf der Farbskala der Packung mit Glucose-Teststreifen sind jeweils die in der Tabelle angegebenen Konzentrationsbereiche zugeordnet.

Die Versuche zur Abtrennbarkeit der nicht immobilisierten und in Calciumalginat-Kugeln eingeschlossenen β -Galactosidase zeigen aber andererseits die Vorteile der Immobilisierung von Enzymen: Während die nicht immobilisierte β -Galactosidase selbst mit einem Faltenfilter nicht vollständig vom Reaktionsgemisch abtrennbar ist, lassen sich die Immobilisat-Kugeln auf einfachste Weise mit einem Haushaltssieb zurückhalten. Das dabei erhaltene Filtrat ist frei von Trübungen. Es wird also deutlich, dass bei immobilisierten Enzymen ein Mehrfacheinsatz möglich ist.

2.1.4.3 Medizin und Pharmazie

Experiment 25: Wundpflaster aus Calciumalginat-Fasern

a) Herstellung von Calciumalginat-Fasern

Chemikalien

Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) („Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), Calciumchlorid-Lösung ($c = 1 \text{ mol/L}$).

Geräte

Reaktionsrohr ($d = 2 \text{ cm}$, $l = 25 \text{ cm}$) mit Gummistopfen (NS 14,5), Messzylinder (50 mL), Spritze (2 mL), Kanülen ($d = 0,45 \text{ mm}$, $l = 12 \text{ mm}$), Pinzette, scharfes Messer, Stativmaterial, Toilettenpapier.

Durchführung

Für die Herstellung der Calciumalginat-Fasern wird zunächst gemäß Abbildung 110 das Reaktionsrohr senkrecht an einem Stativ befestigt. Danach schneidet man den Gummistopfen mit einem scharfen Messer in der Mitte durch, verschließt mit der oberen Stopfenhälfte das Reaktionsrohr am unteren Ende und füllt es anschließend mit 50 mL Calciumchlorid-Lösung. Die Spritze wird mit 1 mL Natriumalginat-Sol gefüllt und unter Einsatz von Toilettenpapier von den anhaftenden Lösungsresten befreit. Die miteingezogene Luftblase lässt man an die Spitze der Spritze aufsteigen ohne sie zu entfernen und setzt erst danach die Kanüle auf. Die angegebenen Arbeitsschritte sollten unbedingt befolgt werden, da ansonsten die Herstellung von Fasern durch das Verstopfen der Kanüle mit Calciumalginat-Gelpfropfen nicht mehr möglich ist.

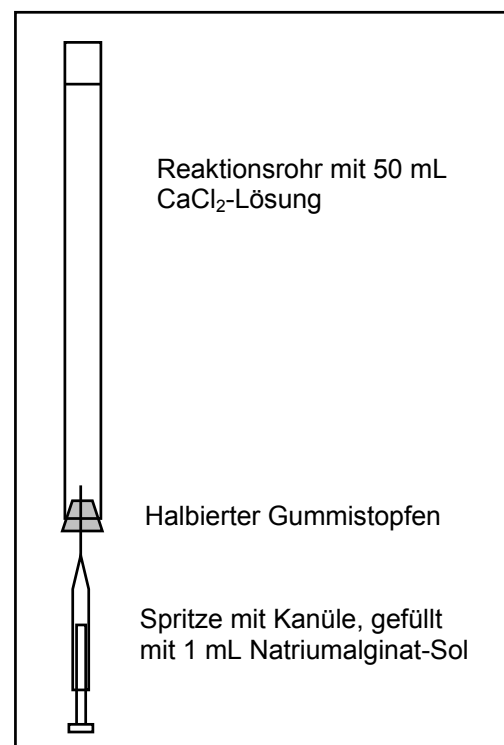


Abb. 110: Versuchsaufbau für die Herstellung von Calciumalginat-Fasern.

Nach vorsichtigem Durchstechen des Gummistopfens drückt man das Sol langsam und gleichmäßig in das vorbereitete Reaktionsrohr mit Calciumchlorid-Lösung. Abschließend wird die Kanüle wieder aus dem Stopfen herausgezogen. Die Spritze ist mehrfach, die Kanüle jedoch nur einmal verwendbar.

Die sich bildende Calciumalginat-Gelfaser steigt sofort nach oben und kann nach einer Aushärtezeit von etwa einer Minute mit Hilfe einer Pinzette aus dem Gelierbad entfernt werden. Die erhaltene Faser wird aufgehängt und an der Luft getrocknet.

b) Analytische Untersuchung von Calciumalginat-Pflastern

Chemikalien

„Fenistil Aktiv-Pflaster bei blutenden Wunden mit Alginat zur Blutstillung“ (Vertrieb: Firma Novartis; rezeptfrei erhältlich in der Apotheke), Salzsäure ($c = 4 \text{ mol/L}$) (**Xi**; R: 36/37/38, S: 28), Ammoniumoxalat-Monohydrat-Lösung ($w = 0,04$), Calciumchlorid-Lösung ($c = 1 \text{ mol/L}$), Natriumacetat, Natriumhydrogencarbonat, entionisiertes Wasser, Universalindikatorpapier (pH-Papier).

Geräte

3 Bechergläser (1 x 25 mL; 2 x 50 mL), Weithalslerlenmeyerkolben (50 mL), Glastrichter ($d = 6 \text{ cm}$) mit passendem Faltenfilter, 2 Pipetten (10 mL), Peleusball, 2 Spritzen (2 mL), 2 Reagenzgläser ($l = 16 \text{ cm}$, $d = 1,6 \text{ cm}$), Reagenzglasständer, Magnetrührer, Rührfisch ($l = 2 \text{ cm}$), Pinzette, 2 Glasstäbe, 2 Spatel, schwarze Pappe.

Durchführung

Die Wundauflage wird mit einer Pinzette vom Pflaster abgezogen und in dem mit Rührfisch versehenen 25-mL-Becherglas in 10 mL Salzsäure-Lösung ($c = 4 \text{ mol/L}$) suspendiert. Nach einer Rührzeit von 20 Minuten wird die Mischung durch den Faltenfilter in den 50-mL-Weithalslerlenmeyerkolben abfiltriert. Im Filtrat sind die Ca^{2+} -Ionen enthalten, die durch die Ionenaustauschreaktion mit Salzsäure aus den Calciumalginat-Fasern freigesetzt wurden. Vor Durchführung des Calcium-Nachweises muss das Filtrat durch Zugabe von festem Natriumacetat unter Rühren mit einem Glasstab auf $\text{pH} = 4 - 5$ abgestumpft werden.

Anschließend füllt man ein Reagenzglas mit 2 mL des abgestumpften Filtrats und ein zweites mit dem gleichen Volumen entionisierten Wassers und gibt jeweils etwa 2 mL Ammoniumoxalat-Monohydrat-Lösung hinzu. Während sich in dem Reagenzglas mit dem Filtrat nach einiger Zeit eine weiße Trübung bildet, tritt in der Probe mit entionisiertem

Wasser keine Reaktion ein. Das Ergebnis der Nachweisreaktion lässt sich durch hinter die Reagenzgläser geklebte schwarze Pappe verdeutlichen.

Für den Alginat-Nachweis suspendiert man in einem 50-mL-Becherglas den aus Alginsäure bestehenden Filtrierrückstand in 10 mL entionisiertem Wasser und neutralisiert unter Rühren mit einem Glasstab durch Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat. Dabei wird die Alginsäure zu wasserlöslichem Natriumalginat umgesetzt. Starke NaHCO_3 -Überschüsse sind zu vermeiden, da ansonsten das im nächsten Schritt auszufällende Calciumalginat-Gel durch CaCO_3 -Bildung weiß getrübt ist.

Das erhaltene Natriumalginat-Sol bringt man in möglichst gleichmäßigem Strahl in ein mit 20 mL Calciumchlorid-Lösung gefülltes 50-mL-Becherglas ein. Es bildet sich ein flockiges, relativ labiles Calciumalginat-Gel.

Experiment 26: Herstellung einer Dentalabdruckmasse auf Alginat-Basis

Chemikalien

Natriumalginat („Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238), Kieselgur („Diatomeenerde, geglüht, gereinigt“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr. Riedel-de Haën 18514) (**Xn**; R: 40/20; S: 22), Calciumsulfat-Dihydrat, Zinkoxid, Natriumdiphosphat, entionisiertes Wasser.

Geräte

Schraubdeckelgefäß aus Polyethylen (500 mL, Weithals), Pulvertrichter (NS 29), Mörser (d = 15 cm) mit Pistill, Teigschaber, Porzellanschale (d = 5 cm), Vampiregebiss, Messzylinder (50 mL), Spatel, Waage.

Durchführung

Zunächst stellt man aus den in Tabelle 79 angegebenen Komponenten ein Dentalabdruckpulver her. Dazu werden die Stoffe nacheinander in das Schraubdeckelgefäß eingewogen (Pulvertrichter!). Nach Zugabe jedes Bestandteils schüttelt man das zugeschraubte Gefäß kräftig.

Tab. 79: Zusammensetzung der alginathaltigen Dentalabdruckmischung.

Inhaltsstoff	Masse in g
Kieselgur	30,75
Natriumalginat	8,25
$\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	7,50
ZnO	2,00
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	1,50

Im Mörser werden 15 g des erhaltenen Dentalabdruckpulvers homogenisiert und mit 35 mL entionisiertem Wasser versetzt. Die Mischung rührt man 45 Sekunden gründlich mit einem Teigschaber und füllt die entstandene Dentalabdruckmasse in die Porzellanschale. Nach Glätten der Oberfläche wird eine Hälfte des Vampirgebisses in die Masse gedrückt. Es dauert etwa fünf Minuten, bis das Calciumalginat-Gel soweit ausgehärtet ist, dass man das Gebiss rückstandslos aus der Abformmasse entfernen kann. Eine Berührung der Geloberfläche mit einem Finger hinterlässt dann keine Spur mehr. Der fertige Abdruck kann nach Ablösen des Randes mit einem kleinen, dünnen Spatel aus der Porzellanschale entnommen werden.

Experiment 27: Herstellung einer alginathaltigen Dentalabdruckmischung mit Farbindikatoren

Chemikalien

Natriumalginat („Manugel DJX“, Firma ISP Alginates oder „Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemica“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238), Kieselgur („Diatomeenerde, gegläht, gereinigt“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Riedel-de Haën 18514) (**Xn**; R: 40/20; S: 22), Calciumsulfat-Dihydrat, Kaliumhexafluorotitanat(IV) (**Xn**; R: 20/21/22; S: 26-36), Natriumphosphat-Dodekahydrat, Thymolphthalein, Phenolphthalein, entionisiertes Wasser.

Geräte

Mörser (d = 15 cm) mit Pistill, Porzellanschale (d = 5 cm), Schraubdeckelgefäß aus Polyethylen (500 mL, Weithals), Pulvertrichter (NS 29), Teigschaber, Vampirgebiss, Messzylinder (50 mL), 8 Spatel, Waage.

Durchführung

Für die Herstellung des Dentalabdruckpulvers werden die in Tabelle 80 angegebenen Komponenten nacheinander in das Schraubdeckelgefäß eingewogen (Pulvertrichter!). Nach Zugabe jedes Bestandteils schüttelt man das zugeschraubte Gefäß kräftig.

Anschließend homogenisiert man im Mörser 15 g des fertigen Dentalabdruckpulvers und gibt 40 mL entionisiertes Wasser hinzu. Bei kräftigem Rühren mit einem Teigschaber entsteht eine violette Masse (Phase 1). Nach einer Anmischzeit von etwa 45 Sekunden färbt sich diese rotviolett (Phase 2) und wird dann in die Porzellanschale überführt und an der Oberfläche glattgestrichen. Sobald ein Farbumschlag nach weiß eintritt (Phase 3), drückt man eine Hälfte des Vampiregebisses

in die Abformmasse. Der Dentalabdruck muss etwa 5 Minuten aushärten, bevor sich das Gebiss rückstandsfrei entfernen lässt. Zum Herauslösen des Calciumalginat-Gels aus der Porzellanschale verwendet man einen kleinen Spatel.

Tab. 80: Zusammensetzung der Dentalabdruckmischung mit Farbindikatoren (Firma Müller-Dental 2001 a).

Inhaltsstoff	Masse in g
Kieselgur	30,900
Natriumalginat	7,000
CaSO ₄ · 2 H ₂ O	8,750
K ₂ [TiF ₆]	1,500
Na ₃ PO ₄ · 12 H ₂ O	1,650
Thymolphthalein	0,015
Phenolphthalein	0,005

Experiment 28: Herstellung eines Alginat-Medikamentes gegen Sodbrennen

Chemikalien

Wässrige Lösung eines Natriumalginats der Standardqualität ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) („Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr. Fluka 71238) oder eines niedrigviskosen Spezialproduktes ($\rho^* = 100 \text{ g/L}$) („Protanal LFR 5/60“, Firma FMC BioPolymer; Vertrieb: Firma Interorgana) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), Kaliumhydrogencarbonat, Calciumcarbonat, Salzsäure ($c = 0,1 \text{ mol/L}$).

Geräte

Präparateglas (30 mL), Weithalslerlenmeyerkolben (100 mL), Spritze (10 mL, ohne Kanüle), Glasstab, 2 Spatel, Waage.

Durchführung

Das alginathaltige Modellmedikament gegen Sodbrennen stellt man folgendermaßen her: In das Präparateglas werden je 200 mg KHCO₃ und CaCO₃ eingewogen. Mit Hilfe der Spritze versetzt man die beiden Salze mit 10 mL Natriumalginat-Sol und verrührt die entstehende Suspension gründlich mit einem Glasstab.

Zur Simulation des sauren Magenmilieus dient ein mit 100 mL Salzsäure gefüllter Erlenmeyerkolben. Das vorbereitete Modellmedikament wird in dünnem Strahl in die Salzsäure mit $\text{pH} = 1$ gegossen.

Es bildet sich spontan ein fadenförmiges Alginsäure-Gel, das mit zunehmender Entwicklung von CO_2 -Gasblasen zur Flüssigkeitsoberfläche aufsteigt. Nach kurzer Zeit hat sich ein zusammenhängender Gel-Schaum gebildet, der den Kolbenhals verschließt.

Experiment 29: Untersuchung der Wirkungsweise käuflicher Alginsäure- Tabletten gegen Sodbrennen

Chemikalien

„Gaviscon[®] Tabletten“ (Vertrieb: Firma Novartis; rezeptfrei erhältlich in Apotheken), Salzsäure ($c = 0,1 \text{ mol/L}$).

Geräte

Becherglas (50 mL), Weithalsmeyerkolben (100 mL), Messzylinder (25 mL), Glasstab, Spatel, Waage.

Durchführung

Wie in Kapitel 2.6.4.4 des Theoretischen Teils geschildert, nimmt man alginsäurehaltige Tabletten gegen sauren Reflux üblicherweise leicht zerkaut mit etwas Flüssigkeit ein. Dieser Vorgang wird experimentell folgendermaßen simuliert:

In einem 50-mL-Becherglas zerstößt man eine „Gaviscon[®] Tablette“ vorsichtig mit einem Spatel und fügt anschließend 10 mL entionisiertes Wasser hinzu. Die Mischung wird so lange mit einem Glasstab gerührt, bis sie anfängt zu schäumen.

Als Modell eines Magens dient im Versuch ein mit 100 mL Salzsäure ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) gefüllter 100-mL-Weithalsmeyerkolben. Bei Zufügen der in Wasser suspendierten Tablette zu der Salzsäure-Lösung mit $\text{pH} = 1$ entsteht zunächst ein flockiges Alginsäure-Gel, das auf den Boden des Kolbens sinkt.

Durch die sich nach kurzer Zeit verstärkende Entwicklung von Kohlenstoffdioxid steigen die Gel-Partikel allmählich nach oben. Nach etwa fünf bis zehn Minuten hat sich am Kolbenhals eine kohärente Schaumschicht gebildet.

Experiment 30: Modellversuch zur In-vivo-Bindung von radioaktivem Strontium**Chemikalien**

Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) („Protanal LF 20/40“, Firma FMC BioPolymer) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), CaCl_2 -Lösung ($w = 0,06$), $\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,04 \text{ mol/L}$), $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,04$), wässrige Natriumrhodizonat-Lösung ($w = 0,001$) (Nur frisch angesetzt verwenden!).

Geräte

Chromatographiesäule mit Hahn ($l = 40 \text{ cm}$, $d = 3 \text{ cm}$) und passendem, durchbohrtem Gummistopfen (NS 29), Tropftrichter ohne Druckausgleich (100 mL, NS 14,5) mit langem Auslauf, 2 Bechergläser (250 mL, hohe Form), 3 Bechergläser (2 x 400 mL, hohe Form; 1 x 800 mL, hohe Form), 2 Weithalslerlenmeyerkolben (1 x 100 mL; 1 x 250 mL), Messzylinder (50 mL), Petrischale ($d = 12 \text{ cm}$), Vollpipette (25 mL) mit Peleusball, Pasteur-Pipetten mit Pipettierhilfen, Reagenzgläser für Handversuche bzw. Demonstrationsexperimente mit passendem Ständer, 2 Glasstäbe, Stabthermometer, Wund- und Blasenspritze (100 mL) mit Adapter (Innendurchmesser der Auslaufspitze: $d = 1,5 \text{ mm}$), 2 Magnetrührer (davon einer heizbar), 2 Rührfische ($l = 4 \text{ cm}$), 2 Haushaltssiebe (1 x 7 cm; 1 x 14 cm Durchmesser), Pulvertrichter (NS 29), Löffelspatel, 2 Rundfilter ($d = 11 \text{ cm}$), Stativmaterial, Stoppuhr, Magnetstab zum Entfernen von Rührfischen, Waage.

Durchführung

Nach der in Experiment 2 beschriebenen Methode stellt man in einem Becherglas (400 mL, hohe Form) zunächst 200 mL Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) her.

Mit Hilfe der vom Stempel befreiten Spritze wird das auf Raumtemperatur abgekühlte Natriumalginat-Sol in ein Becherglas (800 mL, hohe Form) mit 400 mL einer mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) mäßig gerührten Calciumchlorid-Lösung ($w = 0,06$) eingetrofft (zur Versuchsanordnung vgl. Experiment 13). Der Abstand zwischen dem Adapterende und der Flüssigkeitsoberfläche sollte etwa 3 cm betragen. Nach Zugabe des letzten Tropfens lässt man die entstandenen Calciumalginat-Kugeln unter leichtem Rühren 90 Minuten in der Lösung aushärten.

Anschließend werden die Calciumalginat-Perlen mit einem Haushaltssieb ($d = 14 \text{ cm}$) von der Calciumchlorid-Lösung abgetrennt, zweimal gründlich mit je 500 mL entionisiertem Wasser gespült und in einem Becherglas (400 mL, hohe Form) in 100 mL entionisiertem Wasser suspendiert.

Daraufhin versieht man den Boden der Chromatographiesäule mit einem Bausch Glaswolle und füllt sie etwa bis zur Hälfte mit entionisiertem Wasser. Die Säule wird dann unter Zuhilfenahme eines Pulvertrichters und eines Löffelspatels locker mit den in entionisiertem Wasser suspendierten Calciumalginat-Kugeln bepackt, wobei darauf zu achten ist, dass keine Luftblasen entstehen. Abschließend bedeckt man die oberste Schicht der Säulenfüllung mit einem Glaswollebausuch.

Auf die so vorbereitete Ionenaustauschersäule wird ein durchbohrter Gummistopfen aufgesetzt, in dessen Bohrloch sich der Auslauf des Tropftrichters befindet. Letzterer muss so angebracht werden, dass die Spitze des Auslaufs in die Flüssigkeitsschicht oberhalb der Säulenfüllung bedeckenden Glaswollebausuches eintaucht.

Die Säule wird nun bei einer Tropfgeschwindigkeit von etwa 2 Tropfen/s so lange mit 100-mL-Portionen entionisierten Wassers gewaschen, bis im Durchlauf mit $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,04$) keine Calcium-Ionen mehr nachweisbar sind. In der Regel ist dafür das Spülen mit ungefähr 1 L entionisiertem Wasser erforderlich.

Für den Ca^{2+} -Nachweis entnimmt man der zu untersuchenden Waschwasser-Probe, die in einem Weithalserlenmeyerkolben (100 mL) aufgefangen wird, jeweils etwa 6 mL, gibt diese in ein Reagenzglas und versetzt mit ca. 3 mL Reagenzlösung. Ein weißer Calciumoxalat-Niederschlag zeigt die Anwesenheit von Calcium-Ionen an.

Soll der Versuch im Demonstrationsmaßstab durchgeführt werden, so sind für die Nachweisreaktion ungefähr 40 mL Waschwasser und 20 mL $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,04$) zu verwenden.

Bevor der Weithalserlenmeyerkolben zum Auffangen der nächsten 100-mL-Waschwasser-Probe verwendet werden kann, muss er nach vollständiger Verwerfung des Inhaltes zunächst gründlich mit entionisiertem Wasser gespült werden.

Auf die Ca^{2+} -frei gewaschene Säule bringt man nun 25 mL Strontiumchlorid-Lösung ($c = 0,04 \text{ mol/L}$) auf: Dazu wird das mit einer Vollpipette (25 mL) abgemessene Volumen der Lösung in ein Becherglas (250 mL, hohe Form) pipettiert, mit dessen Hilfe in den Tropftrichter überführt und mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 Tropfen/s auf die Säule aufgetropft. Das verwendete Becherglas spült man gründlich mit 100 mL entionisiertem Wasser aus und bringt das Waschwasser ebenfalls auf die Säule. Die Durchlaufgeschwindigkeit sollte dabei wiederum ca. 1 Tropfen/s betragen.

Das in einem Weithalserlenmeyerkolben (250 mL) aufgefangene Eluat-Volumen von etwa 125 mL wird zunächst auf Strontium-Ionen geprüft: Dazu gibt man mit einer Pasteur-Pipette 4 Tropfen auf ein in einer Petrischalenhälfte platzierter Rundfilter und tüpfelt mit 2 Tropfen Natriumrhodizonat-Lösung ($w = 0,001$) nach. Liegt Sr^{2+} vor, so bildet sich unter diesen Bedingungen ein roter Niederschlag. Im Eluat sind bei korrekter Versuchsdurchführung aber keine Strontium-Ionen nachweisbar, da diese unter Verdrängung der Calcium-Ionen von den Alginat-Polyanionen gebunden werden.

Um zu zeigen, dass Strontium-Ionen bei der im Eluat vorliegenden Verdünnung mit der zuvor dargestellten Methode nachweisbar wären, wenn nicht ihre Bindung in der Säule erfolgte, wird die Nachweisreaktion auch mit einer Probe verdünnter Strontiumchlorid-Lösung durchgeführt: Zu diesem Zweck pipettiert man 25 mL $\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 0,04 \text{ mol/L}$) in ein Becherglas (250 mL, hohe Form), versetzt mit 100 mL entionisiertem Wasser, vermischt gründlich mit einem Glasstab und prüft anschließend auf Sr^{2+} . Der Nachweis verläuft in diesem Falle positiv.

Im Eluat lassen sich nach Ausschluss der Anwesenheit von Sr^{2+} die bei der Austauschreaktion freigesetzten Calcium-Ionen auf die oben beschriebene Weise mit $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,04$) nachweisen.

2.1.4.4 Potentielle neue Einsatzzwecke

**Experiment 31: Quantitative Bestimmung von Erdalkalimetall-Kationen
mit Alginsäure-Kationenaustauschern im Säulenbetrieb**

a) Herstellung von Alginsäure-Partikeln

Chemikalien

Guluronatreiches Natriumalginat („Protanal LF 20/40“, Firma FMC BioPolymer, $w(\text{GG}) = 0,55 - 0,60$), Salzsäure p. a. ($c = 1 \text{ mol/L}$), entionisiertes Wasser, Universalindikatorpapier (pH-Papier).

Geräte

3 Bechergläser (1 L, niedrige Form), Magnetrührer, 2 Rührfische ($l = 5 \text{ cm}$), Haushaltssieb ($d = 8 \text{ cm}$), 2 Schnelllauftrichter ($d = 11 \text{ cm}$), 2 Faltenfilter ($d = 24 \text{ cm}$), 2 Weithalserylenmeyerkolben (1 L), Petrischale ($d = 14 \text{ cm}$), Gummiwischer, Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen, Stativmaterial, Spatel, Waage.

Durchführung

Ein mit Rührfisch versehenes 1-L-Becherglas wird mit 600 mL Salzsäure p. a. ($c = 1 \text{ mol/L}$) gefüllt und auf den Magnetrührer gestellt. In den Vortex der mit mittlerer Geschwindigkeit gerührten Lösung siebt man mit Hilfe des Haushaltssiebes portionsweise 25 g Natriumalginat ein. Eventuell am Becherglas anhaftende Algenpolysaccharid-Reste werden unter Einsatz eines Gummiwischers in die Salzsäure-Lösung überführt.

Sobald die Natriumalginat-Partikel mit der Säure in Kontakt kommen, werden sie mit einer oberflächlichen Schicht aus wasserunlöslicher Alginsäure überzogen. Damit gewährleistet ist, dass auch im Inneren eine möglichst vollständige Umwandlung des Alginats in Alginsäure erfolgt, verbleiben die Partikel eine Stunde in der Salzsäure. Während dieser Zeit wird die Lösung weiterhin mit dem Magnetrührer durchmischt.

Nach erfolgter Aushärtung filtriert man die Reaktionsmischung durch einen mit Faltenfilter versehenen Schnelllauftrichter in den 1-L-Weithalslerlenmeyerkolben ab (Flüssigkeitssäule!).

Die Filtration mittels Büchnertrichter und Membranpumpe hat sich als nicht praktikabel erwiesen, da unter diesen Bedingungen der Filter sehr leicht durch Alginat-Reste, die auch im sauren Milieu partiell in Lösung verbleiben, verstopft.

Die im Faltenfilter befindlichen Alginsäure-Partikel werden nun durch Waschen mit entionisiertem Wasser von den anhaftenden Salzsäure-Resten befreit. Dieser Vorgang wird so lange durchgeführt, bis der pH-Wert einer Probe des Spülwassers etwa 5 – 6 beträgt.

Die gespülten Alginsäure-Partikel werden anschließend unter Einsatz eines Gummiwischers möglichst vollständig aus dem Faltenfilter in ein vorher gewogenes, sauberes 1-L-Becherglas überführt. Um diesen Arbeitsschritt zu erleichtern, breitet man den Filter auf einer umgedrehten Petrischalenhälfte ($d = 14 \text{ cm}$) aus.

Nach Bestimmung der Gesamtmasse der Alginsäure-Partikel müssen diese für den Einsatz als Säulenfüllung präpariert werden. Dafür ist es nötig, Teilchen mit sehr geringen Korngrößen abzutrennen, da diese Verstopfungen der Säule verursachen können.

Wie Versuchsreihen mit unterschiedlichen Natriumalginat-Typen ergaben, geschieht die Abtrennung kleiner Partikel am effektivsten auf folgende Weise:

Die gewogenen Alginsäure-Partikel im 1-L-Becherglas werden mit so viel entionisiertem Wasser aufgeschlämmt, dass das Gesamtvolumen der Mischung 600 mL beträgt (Vergleich mit Eichmarke an der Gefäßwand!). Die resultierende Suspension rührt man 80 Sekunden mittels Magnetrührer, entfernt den Rührfisch ($l = 5 \text{ cm}$) und lässt 80 Sekunden absitzen.

Die nach dieser Zeit noch in der Schwebelag befindlichen Alginsäure-Partikel werden nun mit dem Überstand in ein sauberes Becherglas (1 L, niedrige Form) abdekantiert. Ihre Masse ist nach Filtration mittels Schnelllauftrichter ($d = 11 \text{ cm}$) und Faltenfilter ($d = 24 \text{ cm}$) ebenfalls zu bestimmen. Durch Subtraktion dieses Wertes vom Gesamtgewicht der hergestellten Alginsäure kann man abschätzen, wieviel Gramm Partikel in der Säule tatsächlich zum Einsatz kommen (vgl. auch Theoretischer Teil, Kapitel 2.6.5.1).

Die beim Dekantieren als fester Rückstand im Becherglas verbliebenen Alginsäure-Partikel verfügen über Durchmesser, die für den Säuleneinsatz besonders günstig sind.

b) Füllung der Säule

Chemikalien

Für den Säulenbetrieb geeignete Alginsäure-Partikel aus Versuchsteil a), gereinigter Seesand für Chromatographiezwecke, Glaswolle, entionisiertes Wasser.

Geräte

Chromatographiesäule ($l = 40 \text{ cm}$, $d = 2 \text{ cm}$) mit Hahn und Schliff (NS 14,5), Weithalsereimkolumnen (1 L), Pulvertrichter (NS 14,5), Gummiwischer, Stativmaterial.

Durchführung

Zunächst bringt man in die etwa zu $2/3$ mit entionisiertem Wasser gefüllte Säule einen Glaswolle-Bausch ein, den man nach Aufsetzen des Pulvertrichters mit einer Schicht von 1 – 2 cm Seesand bedeckt.

Die beim Dekantieren als fester Rückstand im 1-L-Becherglas verbliebenen Alginsäure-Partikel aus Versuchsteil a) werden dann in wenig entionisiertem Wasser suspendiert und portionsweise in die Säule geschlämmt. Dabei wird der Hahn am Auslauf so weit geöffnet, dass eine kontinuierliche Füllung möglich ist. Um letzte Reste von Alginsäure-Partikeln aus dem Becherglas in die Säule zu überführen, setzt man einen Gummiwischer ein und spült mit entionisiertem Wasser nach.

Die Alginsäure-Schicht wird noch mit einem Glaswolle-Pfropfen abgedeckt, damit die Partikel während des Säulenbetriebes nicht aufwirbeln. Der Flüssigkeitsstand über der Glaswolle sollte so bemessen werden, dass ein Trockenlaufen der Säule unter allen Umständen verhindert wird.

c) Regeneration der Säulenfüllung mit Salzsäure

Chemikalien

Salzsäure p. a. ($c = 4 \text{ mol/L}$) (Xi; R: 36/37/38, S: 28), entionisiertes Wasser, Universalindikatorpapier (pH-Papier).

Geräte

Tropftrichter (100 mL, ohne Druckausgleich) mit Hahn und Schliff (NS 14,5), Glastrichter ($d = 6 \text{ cm}$), Weithalserlenmeyerkolben (1 L), Messzylinder (250 mL), Sicherungsfeder.

Durchführung

Auf die in Versuchsteil b) vorbereitete Säule setzt man einen Tropftrichter (100 mL, ohne Druckausgleich) mit Hahn und gefettetem Schliff (NS 14,5) auf und sichert mit einer Feder.

Zur Regeneration der Alginsäure-Partikel wird die Säule mit 250 mL Salzsäure p. a. ($c = 4 \text{ mol/L}$) behandelt. Die Durchlaufgeschwindigkeit ist dabei auf 1 – 2 Tropfen pro Sekunde einzustellen. Anschließend wird die Säule so lange mit entionisiertem Wasser gespült, bis die austretende Flüssigkeit bei Überprüfung mit Universalindikatorpapier einen pH-Wert von 6 aufweist. In der Regel benötigt man für diesen Vorgang etwa 250 – 350 mL Wasser.

Vor Durchführung der quantitativen Erdalkalimetall-Bestimmung (vgl. Versuchsteil d)) wird der Tropftrichter von der Säule abgenommen und zur Entfernung eventuell vorhandener Salzsäure-Reste gründlich mit entionisiertem Wasser ausgespült.

Regenerierte und auf $\text{pH} = 6$ gebrachte Säulen sollten möglichst bald für die Ionenaustauschversuche verwendet werden, da es bei langem Stehenlassen (z. B. über Nacht) zur Freisetzung kleiner Säuremengen kommt.

d) Quantitative Bestimmung von Erdalkalimetall-Kationen

Chemikalien

Mit Salzsäure regenerierte und neutral gewaschene Säule aus Versuchsteil c), Analysenproben im 100-mL-Messkolben (neutrale Maßlösungen von Calcium-, Strontium- oder Bariumchlorid mit M^{2+} -Gehalten zwischen 0,00125 und 0,00375 mol/100 mL), Ampulle mit Salzsäure zur Herstellung von 1 L Maßlösung ($c = 0,1$ mol/L), Ampulle mit Natronlauge zur Herstellung von 1 L Maßlösung ($c = 0,1$ mol/L) (**C**; R: 35, S: 26-36/37/39-45), Methylrot, Methylenblau (**Xn**; R: 22), Ethanol (**F**, R: 7; S: 11-16), Salzsäure p. a. ($c = 4$ mol/L) (**Xi**; R: 36/37/38, S: 28), entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- Salzsäure-Maßlösung ($c = 0,1$ mol/L, $t = 1,00$; titerstabil),
- NaOH-Maßlösung ($c = 0,1$ mol/L, t ist zu bestimmen),
- Mischindikator-Lösung (**Xn**, **F**; R: 7, S: 11-16) (vgl. Gerstner 1993, S. 91):
Mischung aus 10 mL Methylrot-Lösung ($\rho^* = 1$ g/L in Ethanol) und 2,5 mL Methylenblau-Lösung ($\rho^* = 1$ g/L in Ethanol).

Geräte

6 Weithalslerlenmeyerkolben (250 mL), 4 Vollpipetten (3 x 10 mL, 1 x 20 mL), Magnetrührer, 2 Rührfische ($l = 3$ cm), weißes Papier, Glastrichter ($d = 6$ cm), 2 Messzylinder (1 x 50 mL; 1 x 250 mL), Bürette (50 mL), Bürettenklammer, Stativmaterial, Universalindikatorpapier (pH-Papier).

Durchführung

Zunächst muss der Titer der NaOH-Maßlösung bestimmt werden. Dazu pipettiert man in einen Weithalslerlenmeyerkolben (250 mL) 10 mL Salzsäure ($c = 0,1$ mol/L, $t = 1,00$), fügt 7 Tropfen Mischindikator-Lösung hinzu und füllt bis zur 150-mL-Marke mit entionisiertem Wasser auf. Unter Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 3$ cm) wird die Lösung im Kolben nun mit NaOH-Maßlösung aus der Bürette titriert, bis ein Farbumschlag von rotviolett nach grün eintritt. Damit der Umschlagspunkt besser sichtbar ist, bedeckt man die Metallplatte des Magnetrührers mit einem Stück weißem Papier.

Die Titration wird noch zweimal auf analoge Weise ausgeführt. Der Titer der in der Bürette befindlichen NaOH-Maßlösung berechnet sich dann durch Division von V_{Sol} durch den Mittelwert der tatsächlich verbrauchten Volumina ($= V_{\text{Ist}}$).

Für die Erdalkalimetall-Bestimmung mittels Alginsäure-Austauscher füllt man zunächst den 100-mL-Messkolben mit der Analysenprobe bis zur Eichmarke mit entionisiertem Wasser auf und durchmischt gründlich.

Mit einer Vollpipette werden 20 mL der Analysenlösung direkt in den Tropftrichter über der gemäß Versuchsteil c) regenerierten und bis $\text{pH} = 6$ gewaschenen Alginsäure-Säule pipettiert. Mit einer Geschwindigkeit von 1 Tropfen pro Sekunde bringt man die M^{2+} -haltige Lösung auf die Säule auf und fängt das Eluat in einem Weithalslerlenmeyerkolben (250 mL) auf. Anschließend wird die Säule zweimal nacheinander mit zwei 20-mL- und einer 50-mL-Portion entionisierten Wassers gespült. Bei Kontrolle mittels Universalindikatorpapier sollte nun die aus der Säule austretende Flüssigkeit über einen pH-Wert von 6 verfügen. Ansonsten muss so lange weiter mit entionisiertem Wasser gewaschen werden, bis diese Bedingung erfüllt ist.

Die im Weithalslerlenmeyerkolben enthaltene Lösung wird auf ein Gesamtvolumen von 150 mL aufgefüllt und nach Zufügen von 7 Tropfen Mischindikator-Lösung mit NaOH-Maßlösung ($c = 0,1 \text{ mol/L}$, t) aus der Bürette titriert, bis ein Farbumschlag von rotviolett nach grün zu beobachten ist. Für eine gute Durchmischung des Kolbeninhaltes wird wiederum durch Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 3 \text{ cm}$) gesorgt.

Bevor die Säule für weitere Bestimmungen einsetzbar ist, muss sie nach der in Versuchsteil c) beschriebenen Methode mit 250 mL Salzsäure ($c = 4 \text{ mol/L}$) regeneriert und anschließend mit entionisiertem Wasser gewaschen werden, bis der Ablauf bei Überprüfung mit Universalindikatorpapier einen pH-Wert von 6 zeigt.

Ergebnisse

Vgl. Kapitel 2.6.5.1 des Theoretischen Teils.

Experiment 32: Versuche zur säulenchromatographischen Trennung von Mono- und Disacchariden**a) Herstellung von Säulenfüllungen aus Alginsäure-Partikeln****Chemikalien**

Guluronatreiches Natriumalginat („Protanal LF 20/40“, Firma FMC BioPolymer), mannuronatreiche Natriumalginat („Protanal LF 20/60-L“, Firma FMC BioPolymer; „Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238), Salzsäure p. a. ($c = 1 \text{ mol/L}$), entionisiertes Wasser, Universalindikatorpapier (pH-Papier), gereinigter Seesand für Chromatographiezwecke, Glaswolle.

Geräte

3 Bechergläser (1 L, niedrige Form), Magnetrührer, 2 Rührfische ($l = 5 \text{ cm}$), Haushaltssieb ($d = 8 \text{ cm}$), 2 Schnelllauftrichter ($d = 11 \text{ cm}$), 2 Faltenfilter ($d = 24 \text{ cm}$), 3 Weithalservolumenkolben (1 L), Hälfte einer Petrischale ($d = 14 \text{ cm}$), Chromatographiesäule ($l = 40 \text{ cm}$, $d = 2 \text{ cm}$) mit Hahn und Schliff (NS 14,5), Tropftrichter ohne Druckausgleich (50 oder 100 mL) mit Schliff (NS 14,5), Pulvertrichter (NS 14,5), 2 Gummiwischer, Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen, Stativmaterial, Spatel, Waage.

Durchführung

Die Alginsäure-Partikel werden gemäß der Arbeitsvorschrift in Experiment 31 a) hergestellt, abfiltriert und mit entionisiertem Wasser gespült, bis die mit Universalindikatorpapier untersuchte Abtropfflüssigkeit über einen pH-Wert von 6 verfügt. Anschließend trennt man die für den Säulenbetrieb nicht geeigneten feinen Partikel auf die dort beschriebene Weise ab. Für die Versuche zur Zucker-Trennung sind Berechnungen zur Kapazität der Säule nicht durchführbar. Die Bestimmung der Partikel-Gesamtmasse und das Auswägen der beim Dekantieren abgetrennten Alginsäure können daher unterbleiben.

Abschließend füllt man die Chromatographiesäule mit den vorbereiteten Algenpolysaccharid-Partikeln und setzt den Tropftrichter auf. Dabei wird wie in Experiment 31 b) vorgegangen. Eine Regeneration der Säule mit Salzsäure ($c = 4 \text{ mol/L}$) ist nicht erforderlich.

b) Herstellung von Säulenfüllungen aus Calciumalginat-Partikeln

Chemikalien

Guluronatreiches Natriumalginat („Protanal LF 20/40“, Firma FMC BioPolymer), mannuronatreiche Natriumalginat („Protanal LF 20/60-L“, Firma FMC BioPolymer; „Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238), $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 1 \text{ mol/L}$), $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,04$), entionisiertes Wasser, Universalindikatorpapier (pH-Papier), gereinigter Seesand für Chromatographiezwecke, Glaswolle.

Geräte

2 Bechergläser (1 L), Magnetrührer mit Rührfisch ($l = 5 \text{ cm}$), Haushaltssieb ($d = 8 \text{ cm}$), Schnellauftrichter ($d = 10 \text{ cm}$), Faltenfilter ($d = 24 \text{ cm}$), Weithalsrlenmeyerkolben (1 L), Chromatographiesäule ($l = 40 \text{ cm}$, $d = 2 \text{ cm}$) mit Hahn und Schliff (NS 14,5), Tropftrichter ohne Druckausgleich (50 oder 100 mL) mit Schliff (NS 14,5), Pulvertrichter (NS 14,5), Reagenzgläser, Pasteur-Pipetten mit Pipettierhilfen, Gummiwischer, Stativmaterial, Spatel, Waage.

Durchführung

Die Calciumalginat-Partikel werden gemäß dem für Alginsäure beschriebenen Verfahren durch Einsieben von 25 g Natriumalginat in 600 mL Calciumchlorid-Lösung ($c = 1 \text{ mol/L}$) hergestellt.

Nach einer Aushärtungszeit von einer Stunde filtriert man die erhaltenen Partikel mittels Schnellauftrichter und Faltenfilter von der Calciumchlorid-Lösung ab und wäscht sie mit entionisiertem Wasser Ca^{2+} -frei.

Um das Waschwasser auf Calcium-Ionen zu prüfen, versetzt man jeweils im Reagenzglas eine 2-mL-Probe mit 1 mL $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,04$). Ein weißer CaC_2O_4 -Niederschlag, der oft etwas verzögert auftritt, zeigt die Anwesenheit von Calcium-Ionen an.

Die Abtrennung der Calciumalginat-Partikel, die aufgrund ihrer geringen Korngrößen nicht als Säulenfüllung verwandt werden können, erfolgt in Analogie zu der für Alginsäure-Partikel angegebenen Vorgehensweise. Dies gilt ebenfalls für die Füllung der Chromatographiesäule.

Zum Abschluss der Vorbereitung versieht man die Säule mit einem Tropftrichter.

c) Herstellung von Säulenfüllungen aus Alginsäure-Kugeln

Chemikalien

Wässrige Lösungen von Natriumalginaten mit hohem Guluronat-Gehalt („Protanal LF 20/40“, Firma FMC BioPolymer) bzw. hohem Mannuronat-Gehalt („Protanal LF 20/60-L“, Firma FMC BioPolymer; „Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), Salzsäure p. a. ($c = 1$ mol/L), entionisiertes Wasser, Universalindikatorpapier, gereinigter Seesand für Chromatographiezwecke, Glaswolle.

Geräte

3 Bechergläser (2 x 250 mL, niedrige Form; 1 x 1 L), Chromatographiesäule ($l = 40$ cm, $d = 2,5$ cm) mit Hahn und Schliff (NS 29), Tropftrichter ohne Druckausgleich (100 mL) mit Schliff (NS 29), Messzylinder (100 mL), 2 Magnetrührer (davon einer heizbar), 2 Rührfische ($l = 4$ cm), Wund- und Blasenspritze (100 mL) mit Adapter (Innendurchmesser der Auslaufspitze: $d = 1,5$ mm), 2 Haushaltssiebe (1 x 6 cm; 1 x 13 cm Durchmesser), Pulvertrichter (NS 29), Stabthermometer, Gummiwischer, Glasstab, Magnetstab zum Entfernen von Rührfischen, Löffelspatel, Waage.

Durchführung

Nach der in Experiment 2 vorgestellten Methode werden zunächst 100 mL Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20$ g/L) hergestellt.

Anschließend tropft man 80 mL der auf Raumtemperatur abgekühlten Algenpolysaccharid-Lösung mit Hilfe einer vom Stempel befreiten und mit Adapter versehenen Wund- und Blasenspritze in ein 1-L-Becherglas mit 400 mL Salzsäure-Lösung ($c = 1$ mol/L) ein. Dabei wird die Säure mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 4$ cm) mäßig gerührt (zur Versuchsanordnung vgl. Experiment 13). Der Abstand zwischen dem Adapterende und der Flüssigkeitsoberfläche sollte etwa 3 – 4 cm betragen.

Nach Zugabe des letzten Tropfens lässt man die entstandenen Alginsäure-Kugeln unter leichtem Rühren 30 Minuten in der Lösung aushärten.

Anschließend werden sie mit einem Haushaltssieb ($d = 13$ cm) von der Salzsäure abgetrennt, zweimal gründlich mit je 500 mL entionisiertem Wasser gespült und in einem 250-mL-Becherglas in etwa 100 mL entionisiertem Wasser suspendiert.

Daraufhin versieht man den Boden der Chromatographiesäule mit einem Bausch Glaswolle und füllt sie etwa bis zur Hälfte mit entionisiertem Wasser. Die Säule wird dann unter Zuhilfenahme eines Pulvertrichters und eines Löffelspatels locker mit den in entionisiertem Wasser suspendierten Alginsäure-Kugeln bepackt, wobei darauf zu achten ist, dass keine Luftblasen entstehen. Abschließend bedeckt man die oberste Schicht der Säulenfüllung mit einem Glaswollebausch.

Auf die so vorbereitete Chromatographiesäule wird der 100-mL-Tropftrichter mit Schliff (NS 29) aufgesetzt. Nun wäscht man die Säulenfüllung so lange mit entionisiertem Wasser, bis der pH-Wert des Durchlaufes bei Überprüfung mit Universalindikatorpapier zwischen 5 und 6 liegt. Die Durchlaufgeschwindigkeit sollte während dieses Vorganges etwa 2 Tropfen pro Sekunde betragen.

d) Herstellung von Säulenfüllungen aus Calciumalginat-Kugeln

Chemikalien

Wässrige Lösungen von Natriumalginaten mit hohem Guluronat-Gehalt („Protanal LF 20/40“, Firma FMC BioPolymer) bzw. hohem Mannuronat-Anteil („Protanal LF 20/60-L“, Firma FMC BioPolymer; „Natriumalginat aus Braunalgen, BioChemika“, Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr.: Fluka 71238) (zur Herstellung vgl. Experiment 2), $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 1 \text{ mol/L}$), $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,04$).

Geräte

3 Bechergläser (2 x 250 mL, niedrige Form; 1 x 1 L), Chromatographiesäule ($l = 40 \text{ cm}$, $d = 2,5 \text{ cm}$) mit Hahn und Schliff (NS 29), Tropftrichter ohne Druckausgleich (100 mL) mit Schliff (NS 29), Messzylinder (100 mL), Reagenzgläser, Pasteur-Pipetten mit Pipettierhilfen, 2 Magnetrührer (davon einer heizbar), 2 Rührfische ($l = 4 \text{ cm}$), Wund- und Blasen-spritze (100 mL) mit Adapter (Innendurchmesser der Auslaufspitze: $d = 1,5 \text{ mm}$), 2 Haushaltssiebe (1 x 6 cm; 1 x $d = 13 \text{ cm}$ Durchmesser), Pulvertrichter (NS 29), Stabthermometer, Gummiwischer, Glasstab, Magnetstab zum Entfernen von Rührfischen, Löffel-spatel, Waage.

Durchführung

Die Calciumalginat-Gelkugeln werden in Analogie zu dem für Alginsäure beschriebenen Verfahren durch Eintropfen von 80 mL Natriumalginat-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$) in 400 mL Calciumchlorid-Lösung ($c = 1 \text{ mol/L}$) hergestellt, mittels Haushaltssieb abgetrennt, mit entionisiertem Wasser gespült und in die Chromatographiesäule eingefüllt.

Mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von etwa 2 Tropfen pro Sekunde wäscht man die Säulenfüllung anschließend Ca^{2+} -frei.

Für den Ca^{2+} -Nachweis entnimmt man aus der jeweils zu untersuchenden Waschwasser-Probe ca. 2 mL, gibt diese in ein Reagenzglas und versetzt mit etwa 1 mL $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($w = 0,04$). Ein meist leicht verzögert auftretender weißer Calciumoxalat-Niederschlag zeigt die Anwesenheit von Calcium-Ionen an.

e) Versuche zur säulenchromatographische Zucker-Trennung

Chemikalien

Fructose, Glucose (wasserfrei), Saccharose, entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

Wässrige Lösungen mit Gemischen von Mono- und Disacchariden unterschiedlicher Konzentrationen (s. Ergebnistabelle in Kapitel 2.6.5.2 des Theoretischen Teils).

Geräte

Mit Alginsäure bzw. Calciumalginat gefüllte Chromatographiesäulen mit passenden Tropftrichtern aus den Versuchsteilen a) – d), Becherglas (50 mL), Vollpipetten (10 und 20 mL), Glastrichter ($d = 3,5$ cm), 10 Präparatgläser (30 mL), Stativmaterial, Spatel, Waage.

Durchführung

10 bzw. 20 mL der Lösung mit den zu trennenden Zuckern werden in ein 50-mL-Becherglas eingebracht. Anschließend überführt man den Inhalt des Becherglases in den Tropftrichter und lässt die Zucker-Lösung mit einer Geschwindigkeit von einem Tropfen pro Sekunde auf die vorbereitete Säule einwirken. Das Eluat wird fraktionsweise in 10 Präparatgläsern (30 mL) aufgefangen.

Das Becherglas spült man nacheinander noch dreimal mit möglichst wenig entionisiertem Wasser und bringt dieses ebenfalls auf die Säule auf. Zur Fortführung der Elution ist entionisiertes Wasser zu verwenden.

Die Eluate werden nach der in Experiment 34 a) beschriebenen Methode dünnschichtchromatographisch analysiert.

Negative Ergebnisse

Vgl. Kapitel 2.6.5.3 des Theoretischen Teils.

Experiment 33: Versuche zur Hydrolyse von Saccharose mit Alginsäure-Partikeln im Säulenbetrieb**a) Herstellung von Säulenfüllungen aus Alginsäure-Partikeln**

Gemäß der Arbeitsvorschrift in Experiment 31 a) werden Alginsäure-Partikel hergestellt und in eine Säule gefüllt. Die dafür erforderlichen Chemikalien und Geräte sind dort angegeben.

b) Versuche zur Saccharose-Hydrolyse mit Alginsäure-Säulen**Chemikalien**

Saccharose, Ampulle mit Calciumchlorid-Lösung für 1 L Maßlösung ($\rho^*(\text{Ca}^{2+}) = 10 \text{ g/L}$) („Calcium-Atomspektroskopie-Standard-Konzentrat 10,00 g Ca“, hergestellt aus CaCl_2 und H_2O , Firma Sigma-Aldrich, Best.-Nr. Fluka 03379), entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- Calciumchlorid-Maßlösung ($\rho^*(\text{Ca}^{2+}) = 10 \text{ g/L}$),
- Lösungen von 0,3 g Saccharose in 10 mL entionisiertem Wasser bzw. in 20 oder 40 mL Calciumchlorid-Maßlösung ($\rho^*(\text{Ca}^{2+}) = 10 \text{ g/L}$).

Geräte

Mit Alginsäure-Partikeln gefüllte Chromatographiesäulen mit passenden Tropftrichtern aus Versuchsteil a), Becherglas (50 mL), 2 Vollpipetten (1 x 10 mL, 1 x 20 mL), Messzylinder (50 mL), Glastrichter ($d = 3,5 \text{ cm}$), 10 Präparategläser (30 mL), Stativmaterial, Spatel, Waage.

Durchführung

Das entsprechende Volumen der jeweils eingesetzten Saccharose-Lösung (s. o.) wird in ein 50-mL-Becherglas eingefüllt. Anschließend überführt man den Inhalt des Becherglases in den Tropftrichter und bringt die Zucker-Lösung mit einer Geschwindigkeit von einem Tropfen pro Sekunde auf die vorbereitete Säule auf. Das Eluat wird fraktionsweise in 10 Präparategläsern (30 mL) aufgefangen.

Das Becherglas spült man nacheinander noch dreimal mit möglichst wenig entionisiertem Wasser und lässt dieses ebenfalls auf die Säule einwirken. Zur Fortführung der Elution wird entionisiertes Wasser verwandt.

Die resultierenden Eluat-Fractionen untersucht man nach der in Experiment 34 a) beschriebenen Methode dünnschichtchromatographisch auf Saccharose und ihre eventuell

durch hydrolytische Spaltung entstandenen Monosaccharid-Bausteine Glucose und Fructose.

Negative Ergebnisse

Vgl. Kapitel 2.6.5.3 des Theoretischen Teils.

Experiment 34: Dünnschichtchromatographische Analyse von Mono- und Disacchariden

a) Methode nach Wagner/Sommer (2001, S. 30; verändert)

Chemikalien

Kleine und große DC-Karten („DC-Alufolien, Kieselgel 60 F₂₅₄“, 5 x 10 cm, Firma Merck, Best.-Nr. 116834 und „DC-Alufolien, Kieselgel 60“, 20 x 20 cm, Firma Merck, Best.-Nr. 105553), Fructose, Glucose (wasserfrei), Saccharose, 2-Butanon (Ethylmethylketon) (**F**, **Xi**; R: 11-36-66-67, S: 9-16), Aceton (**F**, **Xi**; R: 11-36-66-67; S: 9-16-26), Borsäure, Ethanol (**F**; R: 11; S: 7-16), Naphthoresorcin (**Xi**; R: 36/37/38, S: 26), konzentrierte Schwefelsäure (w = 0,98) (**C**; R: 35, S: 26-30-45).

Geräte

2 DC-Kammern (klein: d = 7 cm, h = 10 cm; groß: Grundfläche: 23 x 11 cm, h = 21 cm), Glaskapillaren (Schmelzpunktbestimmungsröhrchen, beidseitig offen, d = 0,8 – 1 mm, l = 8 mm), 4 Messzylinder (2 x 25 mL; 2 x 50 mL), 2 Bechergläser (1 x 100 mL; 1 x 250 mL), Messpipette (10 mL), Reagenzglas mit Schliff (NS 14,5), Sprühaufsatz (NS 14,5), Handgebläse, Glastrichter (d = 3,5 cm), Trockenschrank, weicher Bleistift, Lineal, Waage, Spatel.

Anzusetzende Lösungen

- Wässrige Borsäure-Lösung (w = 0,03),
- Zucker-Vergleichslösungen:
Wässrige Lösungen von Fructose, Glucose und Saccharose (jeweils w = 0,005) sowie die jeweils als Referenz benötigte Mischung aus gleichen Volumenteilen dieser Lösungen,

- Fließmittel-Gemisch:
Mischung aus 2-Butanon, Aceton und wässrige Borsäure-Lösung ($w = 0,03$) im Volumenverhältnis 8 : 8 : 5,
- Naphthoresorcin-Schwefelsäure-Reagenz:
40 mg Naphthoresorcin werden in 20 mL Ethanol gelöst und vorsichtig mit 2 mL konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Naphthoresorcin ist luft- und lichtempfindlich und sollte daher möglichst unter Argon aufbewahrt werden. Das hergestellte Reagenz wird zum Besprühen des Chromatogramms in ein Reagenzglas mit Sprühaufsatz eingefüllt. Für eine große DC-Alufolie (20 x 20 cm) benötigt man etwa 10 – 15 mL ethanolische Naphthoresorcin-Schwefelsäure-Lösung, für eine kleine DC-Karte (5 x 10 cm) entsprechend weniger. In einer Schliffflasche aus braunem Glas hält sich das Nachweisreagenz mindestens einen Tag bei Zimmertemperatur.

Durchführung

Für die kleine DC-Kammer werden 15 mL, für die große 100 mL des Fließmittels benötigt. Das Fließmittel sollte jeweils 30 Minuten (kleine Kammer) bzw. eine Stunde (große Kammer) vor Chromatographiebeginn eingefüllt werden, um die Sättigung des Kammerraumes mit Fließmitteldämpfen herbeizuführen.

Auf den DC-Karten markiert man zunächst etwa 1,5 cm vom unteren Rand die Startlinie mit einem weichen Bleistift. Auf diese Linie werden in Abständen von ca. 1 – 1,5 cm mit Hilfe von Glaskapillaren jeweils 1 – 2 Tropfen der Referenzlösungen sowie der zu untersuchenden Proben aufgetragen. Um die Durchmesser der Startflecke möglichst klein zu halten (maximal $d = 2$ mm), setzt man die Kapillare jeweils senkrecht auf die DC-Karte auf und trocknet nach einmaligem Auftragen eines geringen Volumens mit einem Fön.

Die DC-Karte mit den trockenen Substanzflecken wird anschließend zur Entwicklung in die Chromatographiekammer gestellt. Eine ausreichende Auftrennung der Zucker lässt sich mit Laufhöhen des Fließmittels von etwa 7 cm (kleine DC-Karte) und 9 – 12 cm (große Karte) erzielen.

Nach Erreichen der gewünschten Laufhöhe nimmt man die DC-Karte aus der Kammer, kennzeichnet sofort mit einem weichen Bleistift die Fließmittelfront und trocknet mittels Fön unter dem Abzug.

Die Karte wird daraufhin mit dem Nachweisreagenz besprüht und anschließend bei 100 – 120 °C im vorgeheizten Trockenschrank 5 – 10 min getrocknet.

Die farbigen Flecken der Zucker umrandet man mit einem Bleistift, da das Chromatogramm bei längerer Aufbewahrung verblasst.

b) Variationen der Methode

Chemikalien

Wie in Versuchsteil a); außerdem: 1-Butanol (**Xn**; R: 10-22-37/38-41-67, S: 7/9-13-26-37/39-46).

Geräte

Vgl. Versuchsteil a).

Anzusetzende Lösungen

- Wässrige Borsäure-Lösung ($w = 0,03$),
 - Zucker-Vergleichslösungen:
 - Naphthoresorcin-Schwefelsäure-Reagenz,
 - Fließmittel-Gemische:
- } vgl. Versuchsteil a)
- FM 1: 2-Butanon, Aceton, wässrige Borsäure-Lösung ($w = 0,03$) (8 : 8 : 5 VT)
(= Originalfließmittel aus Versuchsteil a)),
- FM 1.1: 2-Butanon, Aceton, entionisiertes Wasser (8 : 8 : 5 VT),
- FM 1.2: 2-Butanon, Aceton, wässrige Borsäure-Lösung ($w = 0,03$) (8 : 8 : 2,5 VT),
- FM 1.3: 2-Butanon, Aceton, wässrige Borsäure-Lösung ($w = 0,03$) (8 : 8 : 10 VT),
- FM 2: 1-Butanol, Aceton, entionisiertes Wasser (2 : 2 : 1 VT),
- FM 3: 1-Butanol, Aceton, entionisiertes Wasser (4 : 5 : 1 VT),
- FM 3: 1-Butanol, Aceton, wässrige Borsäure-Lösung ($w = 0,03$) (4 : 5 : 1 VT).

Durchführung

Nach der Originalmethode von Wagner/Sommer (2001, S. 30) wird zwar Fructose sehr gut von Glucose und Saccharose abgetrennt, aber die R_f -Werte der letztgenannten beiden Zucker unterscheiden sich nicht sehr stark.

Um zu überprüfen, ob sich die Auftrennung von Glucose und Saccharose verbessern lässt, sollen daher folgende methodischen Variationen durchgeführt werden:

- Verlängerung der Laufstrecke des Fließmittels,
- Anwendung von für die Zucker-Trennung bewährten Fließmittel-Gemischen mit anderen Komponenten (vgl. FM 2 – FM 4),
- Veränderung des Borsäure-Anteils im Originalfließmittel (vgl. FM 1.1 – FM 1.3).

Die Anfertigung und Entwicklung der Chromatogramme erfolgt jeweils wie in Versuchsteil a) beschrieben.

Ergebnisse**(1) Verlängerung der Laufstrecke des Fließmittels**

Tab. 81: DC-Analyse von Mono- und Disacchariden nach der Methode von Wagner/Sommer 2001, S. 30: Einfluss längerer Laufzeiten auf die Auftrennung der Zucker-Komponenten.

Zucker	Laufstrecke der Substanz			Laufstrecke des Fließmittels			Retentionsfaktor		
	l_S/cm			l_{FM}/cm			R_f		
	DC 1	DC 2	DC 3	DC 1	DC 2	DC 3	DC 1	DC 2	DC 3
<u>Reinstoffe</u>									
Fructose									
F ₁ (1 Tropfen)	-	2,9	-	-	9,5	-	-	0,31	-
F ₂ (2 Tropfen)	2,25	3,0	3,4	7,1	9,5	11,3	0,32	0,32	0,30
Glucose									
G ₁ (1 Tropfen)	-	6,6	-	-	9,5	-	-	0,69	-
G ₂ (2 Tropfen)	4,6	5,95	6,9	7,1	9,5	11,3	0,65	0,63	0,61
Saccharose									
S ₁ (1 Tropfen)	-	6,7	-	-	9,5	-	-	0,71	-
S ₂ (2 Tropfen)	5,2	6,8	8,2	7,1	9,5	11,3	0,73	0,72	0,73
<u>Mischungen</u>									
Mi ₁ (1 Tropfen)									
Fructose (F _{1, Mi})	-	2,5	-	-	9,5	-	0,26	-	-
Glucose (G _{1, Mi})	-	5,7	-	-	9,5	-	0,60	-	-
Saccharose (S _{1, Mi})	-	6,7	-	-	9,5	-	0,71	-	-
Mi ₂ (2 Tropfen)									
Fructose (F _{2, Mi})	1,9	2,65	2,9	7,1	9,5	11,3	0,27	0,28	0,26
Glucose (G _{2, Mi})	4,35	5,7	6,55	7,1	9,5	11,3	0,62	0,60	0,58
Saccharose (S _{2, Mi})	5,15	6,7	8,0	7,1	9,5	11,3	0,72	0,71	0,71

Wie die in Tabelle 81 in verschiedenen Graustufen unterlegten Werte zeigen, lässt sich durch Verlängerung der Laufstrecke des Fließmittels keine bessere Auftrennung von Glucose und Saccharose erzielen.

In Folgeexperimenten soll daher untersucht werden, ob die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Analyse durch Modifikation des Fließmittelgemisches optimiert werden können.

(2) Anwendung von für die Zucker-Trennung bewährten Fließmittel-Gemischen mit anderen Komponenten (vgl. FM 2 – FM 4)

Um eine Verbesserung der Auftrennung der Zucker – insbesondere von Glucose und Saccharose – zu erzielen, wurden die in Tabelle 82 aufgeführten Fließmittel-Varianten FM 2 – FM 4 eingesetzt, die sich für die DC-Analyse verschiedener Mono- und Disaccharide bewährt haben:

Tab. 82: Fließmittel-Varianten mit anderen Komponenten.

Fließmittel-Gemisch	Volumen-verhältnisse	Ursprüngliches Trennproblem	Literatur
FM 1 2-Butanon, Aceton, B(OH) ₃ (aq) (w = 0,03)	8 : 8 : 5	Fructose, Glucose, Saccharose	Wagner/Sommer (2001, S. 30)
FM 2 1-Butanol, Aceton, Wasser	2 : 2 : 1	Galactose, Glucose, Lactose	Schmidt (1999, S. 19) (modifiziert nach Kringstad 1964, S. 2399)
FM 3 1-Butanol, Aceton, Wasser	4 : 5 : 1	Fructose, Glucose, Saccharose	Stahl (1962, S. 476) (zitiert nach Prey/Berbalk/Kausz 1961, S. 968)
FM 4 1-Butanol, Aceton, B(OH) ₃ (aq) (w = 0,03)	4 : 5 : 1	–	Variante von Stahl (1962, S. 476) mit Borsäure-Lösung statt Wasser

Die mit den Fließmittel-Gemischen FM 2 bis FM 4 erhaltenen Resultate werden einander in Abbildung 111 gegenübergestellt.

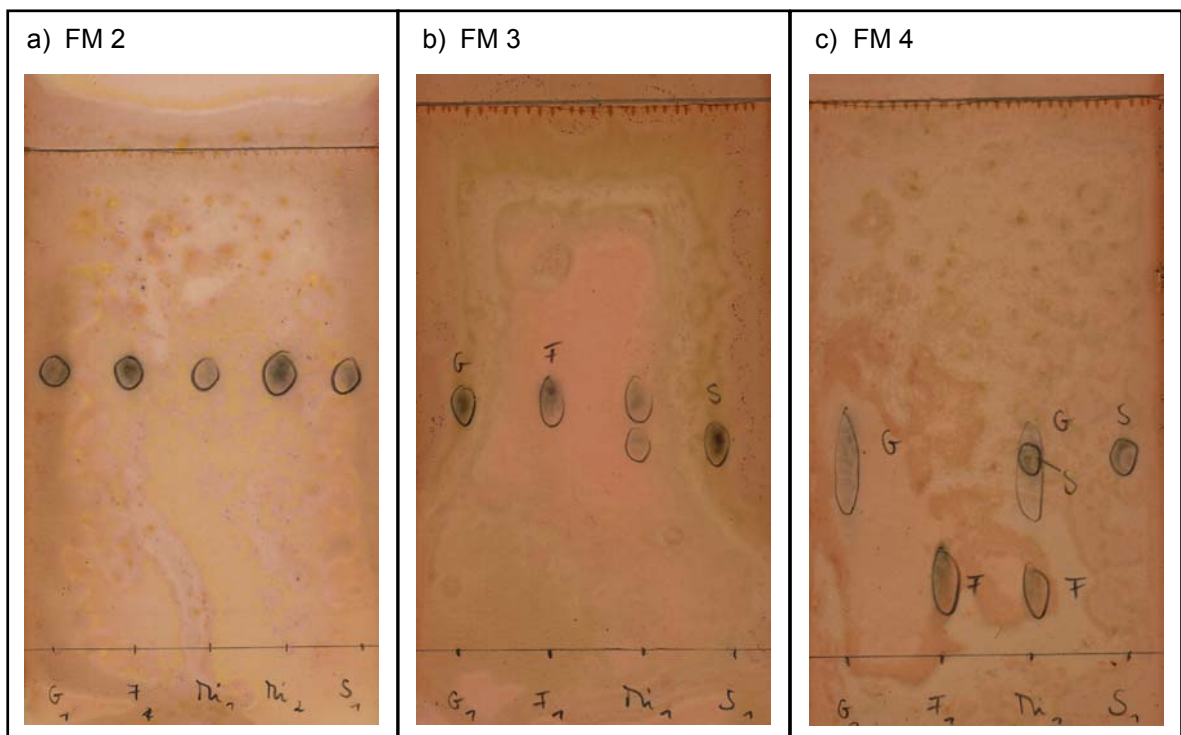


Abb. 111: Ergebnisse der DC-Analyse von Fructose (F), Glucose (G), Saccharose (S) sowie einer Mischung der drei Zucker (Mi) mit den in Tabelle 82 aufgeführten Fließmittelvarianten (Auftragmodi: X₁: 1 Tropfen bzw. X₂: 2 Tropfen der jeweiligen Lösung).

Wie ersichtlich ist, wird mit dem FM 2 überhaupt keine Auftrennung von Fructose, Glucose und Saccharose erzielt.

Durch Erhöhung der Volumenanteile von 1-Butanol und Aceton gegenüber Wasser (FM 3) läuft das Disaccharid zwar weniger weit als die beiden Monosaccharide, aber R_f -Werte von Fructose und Glucose unterscheiden sich praktisch nicht.

Mit FM 4, welches sich von FM 3 dadurch unterscheidet, dass der Wasser-Anteil durch ein gleiches Volumen Borsäure-Lösung ($w = 0,03$) ersetzt wurde, lässt sich Fructose gut von den beiden anderen Zucker-Komponenten des Gemisches separieren. Allerdings liegen die Glucose- und Saccharose-Flecken auf sehr ähnlichen Laufhöhen, was eine saubere Auswertung des Chromatogramms erschwert.

Die Ergebnisse der Versuche zur Variation der Fließmittel-Inhaltsstoffe werden in Tabelle 83 nochmals zusammenfassend dargestellt:

Tab. 83: Variation der Fließmittel-Zusammensetzung zur Optimierung des Trennerfolges.

Zucker	Retentionsfaktoren R_f			
	FM 1	FM 2	FM 3	FM 4
<u>Reinstoffe</u>				
Fructose				
F_1 (1 Tropfen)	0,24	0,48	0,46	0,14
Glucose				
G_1 (1 Tropfen)	0,60	0,48	0,46	0,35
Saccharose				
S_1 (1 Tropfen)	0,67	0,47	0,38	0,35
<u>Mischungen</u>				
Mi_1 (1 Tropfen)				
Fructose ($F_{1, Mi}$)	0,21	0,47	0,46	0,11
Glucose ($G_{1, Mi}$)	0,58	0,47	0,46	0,34
Saccharose ($S_{1, Mi}$)	0,67	0,47	0,37	0,35

Die Trennwirkungen der Fließmittel-Variaten FM 2, FM 3 und FM 4 bleiben insgesamt weit hinter denen des Originalfließmittels (FM 1) zurück. Die in Abbildung 111 und Tabelle 83 dokumentierten Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei 2-Butanon und Borsäure offensichtlich um entscheidende Fließmittel-Komponenten für die Trennung von Fructose, Glucose und Saccharose handelt. Die Rolle von Borsäure für den Trennungserfolg soll daher im Folgenden durch Variation der Zusammensetzung von FM 1 näher untersucht werden.

(3) *Veränderung des Borsäure-Anteils im Originalfließmittel (vgl. FM 1.1 – FM 1.3)*

Da Borsäure als Fließmittel-Komponente für die DC-Analyse von Fructose, Glucose und Saccharose eine entscheidende Rolle spielt, soll untersucht werden, inwieweit sich die Auftrennung der drei Zucker durch Variation des Fließmittel-Gehaltes an $B(OH)_3$ -Lösung ($w = 0,03$) verbessern lässt. Tabelle 84 gibt einen Überblick über die durchgeführten Vergleichsexperimente:

Tab. 84: Variation des Borsäure-Anteils im Originalfließmittel (Wagner/Sommer 2001, S. 30).

Fließmittel-Gemisch	Volumen-verhältnisse	Kommentar
FM 1 2-Butanon, Aceton, $B(OH)_3$ -Lösung ($w = 0,03$)	8 : 8 : 5	Originalfließmittel (Wagner/Sommer 2001, S. 30)
FM 1.1 2-Butanon, Aceton, entionisiertes Wasser	8 : 8 : 5	Ersatz des Borsäure-Anteils durch entionisiertes Wasser
FM 1.2 2-Butanon, Aceton, $B(OH)_3$ -Lösung ($w = 0,03$)	8 : 8 : 2,5	Halbierung des Borsäure-Anteils
FM 1.3 2-Butanon, Aceton, $B(OH)_3$ -Lösung ($w = 0,03$)	8 : 8 : 10	Verdopplung des Borsäure-Anteils

Die experimentellen Ergebnisse werden in den Tabellen 85 a) und b) zusammengestellt: Wie ersichtlich ist, trennt die Fließmittel-Variante ohne Borsäure-Zusatz (FM 1.1) das Zucker-Gemisch überhaupt nicht auf. Auch im Fließmittel mit halbiertem $B(OH)_3$ -Anteil (FM 1.2) sind die Trenneffekte wesentlich schlechter als beim Originalfließmittel (FM 1), insbesondere deshalb, weil die Saccharose- und Glucose-Flecken überlappen. Die Verdopplung des Borsäure-Gehaltes (FM 1.3) bewirkt eine starke Verringerung der R_f -Differenz zwischen Fructose und Glucose, während die Auftrennung von Glucose und Saccharose etwas besser vonstatten geht. Da aber vor allem bei höheren Konzentrationen (vgl. Auftragmodus X_2) die Fructose-Flecken sehr nahe an denen der Glucose liegen, wird für alle weiteren Trennungen das Originalfließmittel (FM 1) verwandt.

Tab. 85: Effekte der Variation des Borsäure-Anteils im Originalfließmittel (zur Zusammensetzung der Fließmittel vgl. Tabelle 84).

a) Auftragmodus X_1 (1 Tropfen jeder Lösung)

Zucker	Retentionsfaktoren R_f			
	FM 1	FM 1.1	FM 1.2	FM 1.3
<u>Reinstoffe</u>				
Fructose				
F_1 (1 Tropfen)	0,24	0,67	0,08	0,48
Glucose				
G_1 (1 Tropfen)	0,60	0,68	0,28	0,72 ^a
Saccharose				
S_1 (1 Tropfen)	0,67	0,67	0,26	0,85
<u>Mischung</u>				
Mi_1 (1 Tropfen)				
Fructose ($F_{1, Mi}$)	0,21	0,68	0,08	0,43
Glucose ($G_{1, Mi}$)	0,58	0,68	0,29	0,75
Saccharose ($S_{1, Mi}$)	0,67	0,68	0,26	0,85

^a In der Glucose-Referenzlösung erscheint in dem Fließmittel mit verdoppeltem Borsäure-Anteil (FM 1.3) neben Glucose immer ein Substanz-Fleck auf, dessen Farbe und Laufhöhe sehr ähnlich sind wie bei Saccharose. Da dieser Effekt auch nach mehrmaligem Austausch der Lösungen und Verwendung einer neuen Glucose-Charge zu beobachten ist, scheint es sich dabei nicht um eine Verunreinigung zu handeln. Eventuell wird durch sehr hohe Borsäure-Konzentrationen die Bildung von anderen Zuckern katalysiert. Da FM 1.3 aber für die Folgeversuche nicht mehr verwandt wird, weil es keine bessere Trennungswirkung zeigt als das Originalfließmittel, soll diese Auffälligkeit nicht weiter untersucht werden.

b) Auftragmodus X_2 (2 Tropfen jeder Lösung)

Zucker	Retentionsfaktoren R_f			
	FM 1	FM 1.1	FM 1.2	FM 1.3
<u>Reinstoffe</u>				
Fructose				
F_2 (2 Tropfen)	0,25	0,70	0,12	0,55
Glucose				
G_2 (2 Tropfen)	0,56	0,74	0,26	0,73 ^a
Saccharose				
S_2 (2 Tropfen)	0,62	0,72	0,27	0,87
<u>Mischung</u>				
Mi_2 (2 Tropfen)				
Fructose ($F_{2, Mi}$)	0,22	0,73	0,10	0,51
Glucose ($G_{2, Mi}$)	0,53	0,73	0,29	0,75
Saccharose ($S_{2, Mi}$)	0,64	0,73	0,28	0,87

^a Vgl. Erläuterung in Tabelle 85 a).

Experiment 35: Hydrolyse von Saccharose mit verdünnten Säuren im Batch-Verfahren**a) Nicht neutralisierte Proben****Chemikalien**

Saccharose, Salzsäure p. a. ($c = 0,1 \text{ mol/L}$ und $c = 1 \text{ mol/L}$), entionisiertes Wasser.

Geräte

2 Bechergläser (100 mL, hohe Form), 2 Messzylinder (50 mL), 2 Magnetrührer, 2 Rührfische ($l = 2 \text{ cm}$), Glaskapillaren (Schmelzpunktbestimmungsröhrchen, beidseitig offen, $d = 0,8 - 1 \text{ mm}$, $l = 8 \text{ mm}$), Spatel, Waage, Stoppuhr.

Durchführung

In die beiden 100-mL-Bechergläser werden jeweils 0,300 g Saccharose eingewogen. Unter Starten der Stoppuhr versetzt man zunächst die erste Saccharose-Probe mit 40 mL Salzsäure ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) und fünf Minuten später die zweite mit dem gleichen Volumen der konzentrierteren Säure ($c = 1 \text{ mol/L}$). Zur Durchmischung wird jeweils mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 2 \text{ cm}$) gerührt.

Aus den beiden Ansätzen werden jeweils nach Reaktionszeiten von 30, 60, 90 und 120 Minuten mit Hilfe von Glaskapillaren Proben entnommen und nach der Methode von Wagner/Sommer (2001, S. 30) dünnschichtchromatographisch untersucht (zur Vorgehensweise vgl. Experiment 34 a)).

Ergebnisse

Wie aus den Ergebnissen in Tabelle 86 ersichtlich ist, wird die Saccharose durch Salzsäure ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) bereits partiell in Fructose und Glucose gespalten. In den den nach Reaktionszeiten von 30, 60, 90 und 120 Minuten entnommenen Hydrolysat-Proben sind das Disaccharid und die als Produkte entstehenden Monosaccharide nebeneinander nachweisbar.

Mit Salzsäure ($c = 1 \text{ mol/L}$) geht die Hydrolyse deutlich schneller vonstatten: Bereits nach 30 Minuten liegen im Reaktionsgemisch nur noch Fructose und Glucose vor.

Tab. 86: Hydrolyse von Saccharose mit Salzsäure ($c = 0,1$ bzw. 1 mol/L) im Batch-Verfahren (Experiment 35 a): Auswertung der DC-Untersuchung der Hydrolysate.

Aufgetragene Zucker-Lösungen	Laufstrecke der Substanz l_S/cm	Laufstrecke des Fließmittels l_{FM}/cm	Retentionsfaktor R_f
<u>Vergleichslösung (2 Tropfen)</u>			
Fructose	3,4	10,05	0,34
Glucose	6,9	10,05	0,69
Saccharose	8,1	10,05	0,81
<u>Hydrolysate (je 2 Tropfen)</u>			
$c(\text{HCl}_{(aq)}) = 0,1$ mol/L, $t = 30$ min			
Fructose	3,0	10,05	0,30
Glucose	6,65	10,05	0,66
Saccharose	8,0	10,05	0,80
$c(\text{HCl}_{(aq)}) = 0,1$ mol/L, $t = 60$ min			
Fructose	3,1	10,05	0,31
Glucose	6,8	10,05	0,68
Saccharose	7,9	10,05	0,79
$c(\text{HCl}_{(aq)}) = 0,1$ mol/L, $t = 90$ min			
Fructose	2,9	10,05	0,29
Glucose	6,7	10,05	0,67
Saccharose	7,9	10,05	0,79
$c(\text{HCl}_{(aq)}) = 0,1$ mol/L, $t = 120$ min			
Fructose	3,05	10,05	0,30
Glucose	6,7	10,05	0,66
Saccharose	7,85	10,05	0,78
$c(\text{HCl}_{(aq)}) = 1$ mol/L, $t = 30$ min			
Fructose	3,6	10,05	0,36
Glucose	6,7	10,05	0,67
Saccharose	–	–	–
$c(\text{HCl}_{(aq)}) = 1$ mol/L, $t = 60$ min			
Fructose	3,55	10,05	0,35
Glucose	6,7	10,05	0,67
Saccharose	–	–	–
$c(\text{HCl}_{(aq)}) = 1$ mol/L, $t = 90$ min			
Fructose	3,5	10,05	0,35
Glucose	6,8	10,05	0,68
Saccharose	–	–	–
$c(\text{HCl}_{(aq)}) = 1$ mol/L, $t = 120$ min			
Fructose	3,5	10,05	0,35
Glucose	6,75	10,05	0,67
Saccharose	–	–	–

b) Mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisierte Proben**Chemikalien**

Wie in Versuchsteil a); zusätzlich: Natriumhydrogencarbonat.

Geräte

Wie in Versuchsteil a); zusätzlich: 8 Spritzen (1 mL), 8 Präparategläser (30 mL).

Durchführung

Die Reaktionsmischungen werden in Analogie zu Versuchsteil a) mit einer zeitlichen Versetzung von 5 min angesetzt und mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 2 \text{ cm}$) kontinuierlich gerührt.

Aus den beiden Ansätzen werden wiederum nach Reaktionszeiten von 30, 60, 90 und 120 Minuten mit Hilfe von Einwegspritzen 1-mL-Proben entnommen. Um die Hydrolyse abzuhalten, lässt man jede 1-mL-Probe in ein Präparateglas mit 0,5 g Natriumhydrogencarbonat einfließen und schwenkt um. Für die dünnschichtchromatographische Analyse wartet man, bis sich das überschüssige Natriumhydrogencarbonat abgesetzt hat und entnimmt dann jeweils mit einer Glaskapillare eine Probe aus dem klaren Überstand.

Die DC-Analyse der neutralisierten Proben wird gemäß der Arbeitsvorschrift in Experiment 34 a) durchgeführt.

Ergebnisse

Bei den Hydrolysat-Proben ergeben sich im Chromatogramm (vgl. Abbildung 112) verschmierte Banden, aus denen nicht ersichtlich ist, inwieweit eine Aufspaltung der Saccharose in Glucose und Fructose erfolgt ist. Dieser Effekt ist offensichtlich auf den hohen Natriumhydrogencarbonat-Gehalt der neutralisierten Hydrolysate zurückzuführen, da er bei den Vergleichslösungen, die kein NaHCO_3 enthalten, nicht auftritt.

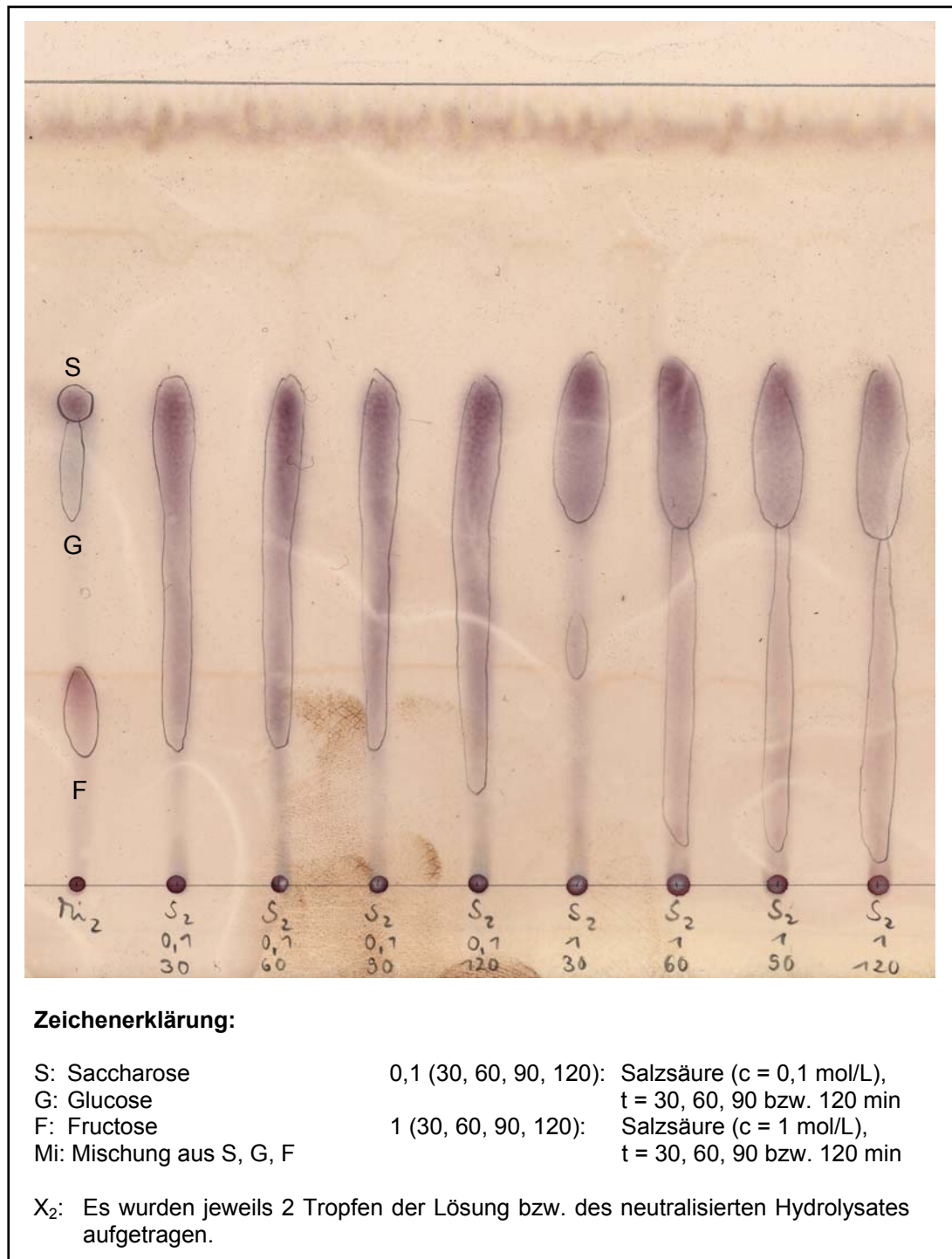


Abb. 112: Hydrolyse von Saccharose mit verdünnter Salzsäure im Batch-Verfahren: DC-Analyse der mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisierten Hydrolysate (vgl. Experiment 35 b)).

c) Mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisierte Proben

Chemikalien

Vgl. Versuchsteil a); zusätzlich: NaHCO_3 -Lösung ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), NaHCO_3 -Lösung ($c = 1 \text{ mol/L}$).

Geräte

Vgl. Versuchsteil a); zusätzlich: 16 Spritzen (1 mL), 8 Präparategläser (30 mL).

Durchführung

Wie in Versuchsteil a) beschrieben, werden die Reaktionsmischungen mit einer zeitlichen Versetzung von 5 min angesetzt und mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 2 \text{ cm}$) kontinuierlich gerührt.

Nach Reaktionszeiten von 30, 60, 90 und 120 Minuten entnimmt man unter Einsatz von Spritzen aus beiden Ansätzen 1-mL-Proben, lässt diese jeweils in Präparategläser mit 1,5 mL Natriumhydrogencarbonat-Lösung ($c(\text{NaHCO}_3) = 0,1 \text{ mol/L}$ (Ansatz 1) bzw. $c(\text{NaHCO}_3) = 1 \text{ mol/L}$ (Ansatz 2) einfließen und schwenkt um.

Für die dünnschichtchromatographische Analyse werden Proben aus den Präparategläsern mit neutralisierter Zucker-Lösung auf eine DC-Karte aufgetragen. Bei der Herstellung und Entwicklung des Chromatogramms verfährt man wie in Experiment 34 a).

Ergebnisse

Wie die Ergebnisse der DC-Analyse in Tabelle 87 verdeutlichen, kann man in dem Ansatz mit Salzsäure ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) Anzeichen für die Disaccharid-Spaltung erst nach 60, 90 und 120 Minuten erkennen. Hier zeigen sich im Chromatogramm schwache Fructose-Flecken. In der Reaktionsmischung mit Salzsäure ($c = 1 \text{ mol/L}$) liegt das Monosacharid hingegen bereits nach dreißigminütiger Reaktionszeit in geringer und nach 60, 90 und 120 Minuten in höherer Konzentration vor.

Die Glucose- und Saccharose-Flecken sind weder räumlich noch farblich klar separiert, was vermutlich wiederum auf das Verschmieren der Banden durch hohe Natriumhydrogencarbonat-Gehalte zurückzuführen ist. Eine klare Entscheidung, ob die Saccharose vollständig hydrolysiert wurde, kann daher nicht getroffen werden.

Tab. 87: Hydrolyse von Saccharose mit Salzsäure ($c = 0,1$ bzw. 1 mol/L) im Batch-Verfahren: DC-Auswertung der mit NaHCO_3 -Lösung neutralisierten Proben (Experiment 35 c)).

Aufgetragene Zucker-Lösungen	Laufstrecke der Substanz l_s/cm	Laufstrecke des Fließmittels l_{FM}/cm	Retentionsfaktor R_f
<u>Vergleichslösung (2 Tropfen)</u>			
Fructose	3,2	11,2	0,29
Glucose	6,1	11,2	0,54
Saccharose	6,9	11,2	0,62
<u>Hydrolysate (je 2 Tropfen)</u>			
c ($\text{HCl}_{(aq)}$) = $0,1 \text{ mol/L}$, t = 30 min			
Fructose	2,8	11,2	0,25
Glucose	6,0	11,2	0,54
Saccharose	7,0	11,2	0,63
c ($\text{HCl}_{(aq)}$) = $0,1 \text{ mol/L}$, t = 60 min			
Fructose	-	11,2	-
Glucose	-	11,2	-
Saccharose	6,95	11,2	0,62
c ($\text{HCl}_{(aq)}$) = $0,1 \text{ mol/L}$, t = 90 min			
Fructose	(2,25) ^a	11,2	0,20
Glucose	-	11,2	-
Saccharose	7,0	11,2	0,63
c ($\text{HCl}_{(aq)}$) = $0,1 \text{ mol/L}$, t = 120 min			
Fructose	(2,3) ^a	11,2	0,21
Glucose	-	11,2	-
Saccharose	7,0	11,2	0,63
c ($\text{HCl}_{(aq)}$) = 1 mol/L , t = 30 min			
Fructose	(2,3) ^a	11,2	0,21
Glucose	-	11,2	-
Saccharose	6,95	11,2	0,62
c ($\text{HCl}_{(aq)}$) = 1 mol/L , t = 60 min			
Fructose	(2,5) ^b	11,2	0,22
Glucose	(6,1) ^b	11,2	0,55
Saccharose	(6,7) ^b	11,2	0,60
c ($\text{HCl}_{(aq)}$) = 1 mol/L , t = 90 min			
Fructose	(2,5) ^b	11,2	0,22
Glucose	(6,1) ^b	11,2	0,55
Saccharose	(6,7) ^b	11,2	0,60
c ($\text{HCl}_{(aq)}$) = 1 mol/L , t = 120 min			
Fructose	(2,5) ^b	11,2	0,22
Glucose	(6,1) ^b	11,2	0,55
Saccharose	(6,7) ^b	11,2	0,60

^a Nur schwach erkennbar.

^b Die Fructose-, Glucose- und Saccharose-Flecken sind nicht klar begrenzt. Außerdem haben sich Glucose und Saccharose nicht vollständig aufgetrennt.

2.2 Carrageenane

2.2.1 Chemischer Aufbau und Struktur

Experiment 36: Hydrolyse von λ -Carrageenan und Nachweis reduzierender Zucker mittels Fehling-Reaktion

Chemikalien

Nicht standardisiertes λ -Carrageenan („JEW 040“, Firma Eurogum), halbkonzentrierte Salzsäure (1 : 1) (**C**; R: 34-37; S: 25-45), Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat (**Xn, N**; R: 22-36/38-50/53; S: 22-60-61), Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat, Natriumhydroxid (**C**; R: 35; S: 26-37/39-45), Natriumhydrogencarbonat, Universalindikatorpapier (pH-Papier).

Anzusetzende Lösungen

- λ -Carrageenan-Sol ($\rho^* = 20$ g/L) (zur Herstellung vgl. Durchführung und Experiment 37 a)),
- Fehlingsche Lösung 1:
7 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ mit entionisiertem Wasser zu $V = 100$ mL lösen,
- Fehlingsche Lösung 2:
34 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ und 10 g NaOH mit entionisiertem Wasser zu $V = 100$ mL lösen (**C**; R: 35; S: 26-37/39-45).

Geräte:

Becherglas (400 mL, niedrige Form), 2 Weithalslerlenmeyerkolben (1 x 50 mL; 1 x 100 mL), Uhrglas ($d = 4$ cm), 2 Messkolben (100 mL), Vollpipette (10 mL), Peleusball, 5 Spritzen (2 x 1 mL, 2 x 2 mL, 1 x 10 mL; jeweils ohne Kanülen), 2 Reagenzgläser ($l = 16$ cm, $d = 1,6$ cm), Reagenzglasständer, 2 Glasstäbe, Magnetrührer mit Kontaktthermometer, 3 Rührfische (1 x 3 cm, 1 x 4 cm, 1 x 5 cm), Spatel, Waage, Stativmaterial, Magnetstab zum Entfernen von Rührfischen.

Durchführung

In einem mit Rührfisch ($l = 4$ cm) versehenen Weithalslerlenmeyerkolben (100 mL) werden 50 mL des λ -Carrageenan-Sols ($\rho^* = 20$ g/L) gemäß der in Experiment 37 a) angegebenen Arbeitsvorschrift hergestellt.

Zur Durchführung der Hydrolyse des Carrageenans bringt man in einen Weithalslerlenmeyerkolben (50 mL) 10 mL λ -Carrageenan-Sol ($\rho^* = 20$ g/L). Wegen der hohen Viskosität der Lösung sollte zum Abmessen eine 10-mL-Spritze ohne Kanüle verwandt werden.

Nun versetzt man mit 10 mL halbkonzentrierter Salzsäure, bedeckt den Kolben mit einem Uhrglas ($d = 4 \text{ cm}$) und erhitzt in einem vorher auf $\vartheta_{\text{konstant}} = 90 \text{ °C}$ temperierten Wasserbad 20 min unter Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 3 \text{ cm}$). Als Wasserbad dient ein mit entionisiertem Wasser gefülltes und mit einem Rührfisch ($l = 5 \text{ cm}$) versehenes Becherglas (400 mL, niedrige Form).

Das Hydrolysat wird anschließend vorsichtig (starke Schaumbildung!) unter Rühren mit einem Glasstab durch Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert.

Für den Nachweis reduzierender Zucker vermischt man in einem Reagenzglas je 2 mL Fehlingscher Lösung 1 und 2 und fügt mit einer Einwegspritze (1 mL, ohne Kanüle) 1 mL des neutralisierten Hydrolysates hinzu. Bei Erhitzen dieses Reaktionsgemisches im Wasserbad ($\vartheta_{\text{konst.}} = 90 \text{ °C}$) bildet sich nach etwa drei Minuten ein dunkelroter Niederschlag von Cu_2O .

Wenn die Fehling-Reaktion unter den oben angegebenen Bedingungen mit 1 mL der nicht hydrolysierten λ -Carrageenan-Lösung durchgeführt wird, so verläuft sie negativ.

2.2.2 Charakteristische Eigenschaften

Experiment 37: Sol- und Gelbildungsverhalten von κ -, ι - und λ -Carrageenanen

a) Herstellung wässriger Carrageenan-Lösungen

Chemikalien

Nicht standardisierte κ -, ι - und λ -Carrageenane (z. B. „SPF 042“ (κ), „S 1495“ (ι), „JEW 040“ (λ), Firma Eurogum), entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

Wässrige Lösungen von κ -, ι - und λ -Carrageenan ($c \approx 0,025 \text{ mol/L}$) (zur Vorgehensweise vgl. Durchführung).

Geräte

3 Weithalslerlenmeyerkolben (100 mL), Kristallisierschale ($d = 19 \text{ cm}$), 2 heizbare Magnet-rührer, Kontaktthermometer, 4 Rührfische (3 x 4 cm, 1 x 5 cm), Stabthermometer, Waage, Stativmaterial, Magnetstab zum Entfernen von Rührfischen.

Durchführung

Je 50 mL der wässrigen Lösungen von κ -, ι - und λ -Carrageenan ($c \approx 0,025$ mol/L) sind nach folgender Vorschrift herzustellen: In einem Weithalslerlenmeyerkolben (100 mL) wird jeweils die in Tabelle 88 angegebene Menge des betreffenden Carrageenans unter Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 4$ cm) in 50 mL kaltem, entionisiertem Wasser suspendiert. Dabei ist es wichtig, zuerst das Wasser einzufüllen und dann das Carrageenan zuzugeben, da ansonsten die Gefahr besteht, dass konzentrierte Sole beim nachfolgenden Erhitzen anbrennen.

Die vorbereitete Carrageenan-Suspension wird anschließend bei hoher Rührgeschwindigkeit auf $\vartheta = 80$ °C erwärmt (Kontrolle mit dem Stabthermometer). Sobald die gewünschte Temperatur erreicht ist, stellt man die Heizung des Magnetrührers ab und rührt so lange weiter, bis sich das Algenpolysaccharid vollständig gelöst hat.

Tab. 88: Für die Herstellung von 50 mL der wässrigen κ -, ι - und λ -Carrageenan-Lösungen ($c \approx 0,025$ mol/L) benötigte Mengen des jeweiligen Algenpolysaccharids.

Carrageenan-Typ	Molmasse einer dimeren Carrageenan-Grundeinheit in g/mol	Einzusetzende Masse des Carrageenans in g
κ	401,325	0,502
ι	480,381	0,600
λ	577,452	0,722

Nach Entfernen der Rührfische müssen die angesetzten Carrageenan-Lösungen bis zu ihrer Verwendung in Versuchsteil b) auf 60 °C temperiert werden, da unterhalb dieser Temperatur bereits Gelbildungsprozesse einsetzen. Es empfiehlt sich daher, bereits vor Versuchsbeginn ein aus einer mit Wasser gefüllten Kristallisierschale ($d = 19$ cm) bestehendes Wasserbad auf $\vartheta_{\text{konst.}} = 60$ °C vorzuheizen. Mit Hilfe eines Rührfisches ($l = 5$ cm) ist dabei für eine gute Durchmischung des Bades zu sorgen.

Die Erlenmeyerkolben mit den hergestellten Carrageenan-Solen werden dann einzeln an Stativen fixiert und jeweils in die Kristallisierschale mit dem 60 °C warmen Wasser eingebracht.

Um Carrageenan-Sole der Konzentration $c = 0,025$ mol/L herzustellen, müsste man eigentlich noch mit entionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 mL auffüllen. Die durch Erhitzen bedingten Volumenverluste können aber nicht auf diese Weise ausgeglichen werden, da die Sole so konzentriert sind, dass bei Zufügen von kaltem Wasser im Falle des κ - und ι -Carrageenans bereits die Gelbildung erfolgen würde. Für den vorliegenden Versuch ist aber nicht die absolute Konzentration der Carrageenan-Lösungen von Bedeutung, sondern es muss lediglich die Voraussetzung erfüllt sein, dass die Konzentrationen der drei Sole übereinstimmen. Aufgrund der Tatsache, dass die κ -, ι - und λ -Carrageenan-Lösungen ($c \approx 0,025$ mol/L) allesamt nach der gleichen

Carrageenan-Lösungen ($c \approx 0,025$ mol/L) allesamt nach der gleichen Herstellungsvorschrift angesetzt werden, entsprechen sich die aus der Erwärmung resultierenden Verdunstungsverluste und sind folglich für das Versuchsergebnis irrelevant.

Werden für einen Versuch nur Lösungen von λ -Carrageenan benötigt (vgl. Experimente 36, 38, 39, 40, 42), so können die Sole ohne Probleme abgekühlt und mit kaltem entionisiertem Wasser auf das geforderte Gesamtvolumen gebracht werden, da diese Variante des Algenpolysaccharids nicht gelbildungsfähig ist. Wenn die angesetzten λ -Carrageenan-Lösungen auf Zimmertemperatur abgekühlt sind, entfernt man die Rührfische mit Hilfe eines Magnetstabes unter Abspülen und füllt anschließend jeweils mit entionisiertem Wasser bis zur entsprechenden Volumenmarke der Weithalslerlenmeyerkolben auf. Für eine gute Durchmischung der Sole wird durch Rühren mit einem Glasstab gesorgt.

b) Demonstration der unterschiedlichen Gelbildungseigenschaften der drei Carrageenan-Typen

Chemikalien

Auf 60 °C temperierte wässrige Lösungen der nicht standardisierten κ -, ι - und λ -Carrageenane ($c \approx 0,025$ mol/L) aus Versuchsteil a), $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 1,5$ mol/L), KCl-Lösung ($c = 1,5$ mol/L), entionisiertes Wasser.

Geräte

3 Messzylinder (25 mL), 6 kurze Glasstäbe, 6 Petrischalen aus Polystyrol ($d = 9,4$ cm), 6 Spritzen (2 mL; ohne Kanülen).

Durchführung

Zur Untersuchung der Gelbildungseigenschaften der verschiedenen Carrageenan-Typen werden jeweils 20 mL der im Wasserbad auf $\vartheta = 60$ °C gebrachten Sole von κ -, ι - und λ -Carrageenan ($c \approx 0,025$ mol/L) in die Unterteile der Petrischalen aus Polystyrol ($d = 9,4$ cm) eingefüllt. Mit Hilfe von Einwegspritzen (2 mL) fügt man zu jedem der Sole unter Rühren mit einem kurzen Glasstab zügig 2 mL $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ($c = 1,5$ mol/L) hinzu. Während in den Petrischalen mit den κ - und ι -Carrageenan-Solen sofort nach Zusatz der Calciumchlorid-Lösung eine Gelbildung beobachtbar ist, tritt diese Reaktion im Falle der λ -Carrageenan-Lösung nicht ein.

In drei weiteren Petrischalenunterteilen versetzt man auf die zuvor beschriebene Weise je 20 mL der 60 °C warmen Carrageenan-Sole mit 2 mL KCl-Lösung ($c = 1,5 \text{ mol/L}$). Auch hier ist nur in den Petrischalen mit den κ - und ι -Carrageenan-Solen ein Gelieren der Lösungen zu erkennen. Im λ -Carrageenan-Sol bleibt dieser Effekt aus.

Ergebnisse:

Vgl. Kapitel 3.3.2.2 des Theoretischen Teils.

Experiment 38: Demonstration des Faraday-Tyndall-Effektes bei λ -Carrageenan-Lösungen

Chemikalien

Wässrige Lösung eines nicht standardisierten λ -Carrageenans („JEW 040“, Firma Eurogum) (zur Herstellung vgl. Experiment 37 a)), Natriumchlorid-Lösung ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$), D(+)-Glucose-Monohydrat-Lösung ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$).

Geräte

4 Reagenzgläser ($l = 16 \text{ cm}$, $d = 1,6 \text{ cm}$), Reagenzglasständer, Taschenlampe.

Durchführung

Zur Demonstration des Faraday-Tyndall-Effekts füllt man vier Reagenzgläser jeweils bis zur Hälfte mit

- λ -Carrageenan-Sol,
- NaCl-Lösung,
- Glucose-Lösung,
- entionisiertem Wasser.

Die Lösungen werden in einem abgedunkelten Raum nacheinander mit dem Lichtstrahl einer Taschenlampe durchleuchtet (Umstellen von Lichtkegel auf gebündeltes Licht!). Der Faraday-Tyndall-Effekt tritt nur in der Probe mit dem λ -Carrageenan-Sol auf.

Experiment 39: Stabilisierung von Emulsionen durch λ -Carrageenan**Chemikalien**

3 wässrige λ -Carrageenan-Lösungen („Genuvisco CSW-2“, Firma CP Kelco) (zur Herstellung vgl. Experiment 37 a)), Lösung von Sudanrot B in Speiseöl, entionisiertes Wasser.

Geräte

3 Weithalslerlenmeyerkolben (100 mL), 4 Reagenzgläser (l = 16 cm, d = 1,6 cm) mit passenden Gummistopfen, Reagenzglasständer, 3 Glasstäbe, Magnetrührer (heizbar), 3 Rührfische (l = 4 cm), Spritze (1 mL; ohne Kanüle), Magnetstab zum Entfernen von Rührfischen, Waage.

Durchführung

Um die Stabilisierung von Emulsionen durch λ -Carrageenan zu untersuchen, füllt man vier Reagenzgläser bis zu einer Füllhöhe von 4 cm mit

- entionisiertem Wasser,
- λ -Carrageenan-Sol ($\rho^* = 5 \text{ g/L}$),
- λ -Carrageenan-Sol ($\rho^* = 10 \text{ g/L}$) bzw.
- λ -Carrageenan-Sol ($\rho^* = 20 \text{ g/L}$).

Nach Zugabe von je 1 mL der Lösung von Sudanrot B in Speiseöl ($\rho^* = 0,5 \text{ g/L}$) werden die Reagenzgläser mit Gummistopfen verschlossen, jeweils fünf Sekunden lang kräftig geschüttelt und zur Beobachtung in den Reagenzglasständer gestellt.

Die Probe mit entionisiertem Wasser ist schon nach etwa einer Minute im unteren Bereich aufgehellt, und nach zehn Minuten hat sich die mit Sudanrot B gefärbte Öl-Phase gut erkennbar von der Wasser-Phase abgetrennt. Dahingegen beobachtet man in den carrageenanhaltigen Ansätzen ein deutlich verzögertes Eintreten der Entmischung. Die Emulsionsstabilität nimmt mit steigender Massenkonzentration des Algenpolysaccharids zu. Unterschiede innerhalb der Konzentrationsreihe werden am besten nach 30 – 40 Minuten sichtbar: Während sich zu diesem Zeitpunkt in dem Ansatz mit dem λ -Carrageenan-Sol ($\rho^* = 5 \text{ g/L}$) bereits deutlich eine rote Öl-Phase abgesetzt hat, ist in der nächst höher konzentrierten Probe die Phasenseparation noch nicht so weit fortgeschritten. Eine vom Reagenzglasboden ausgehende Aufhellung ist allerdings auch hier gut erkennbar. In der Emulsion mit der höchsten Massenkonzentration an λ -Carrageenan sind Anzeichen einer Entmischung gar nicht oder nur minimal zu beobachten.

Experiment 40: Stabilisierung von Suspensionen durch λ -Carrageenan**Chemikalien**

Wässrige λ -Carrageenan-Lösung ($\rho^* = 10\text{g/L}$) („JEW 040“, Firma Eurogum oder „Genuvisco CSW“, Firma CP Kelco) (zur Herstellung vgl. Experiment 37 a)), Seesand für Chromatographiezwecke, entionisiertes Wasser.

Geräte

Weithalslerlenmeyerkolben (100 mL), 2 Reagenzgläser (l = 16 cm, d = 1,6 cm) mit passenden Gummistopfen, Reagenzglasständer, kleiner Glastrichter (d = 3 cm), Glasstab, Magnetrührer (heizbar), Rührfisch (l = 4 cm), Magnetstab zum Entfernen von Rührfischen, kleiner Spatel (Halbmikro-Maßstab), Waage.

Durchführung

In einem mit Rührfisch (l = 4 cm) ausgestatteten Weithalslerlenmeyerkolben (100 mL) stellt man 50 mL des λ -Carrageenan-Sols mit der oben angegebenen Massenkonzentration nach der in Experiment 37 a) beschriebenen Methode her.

Um die suspensionsstabilisierende Wirkung von λ -Carrageenan zu untersuchen, füllt man zwei Reagenzgläser bis zu einer Höhe von 4 cm mit

- entionisiertem Wasser bzw.
- λ -Carrageenan-Sol ($\rho^* = 10\text{ g/L}$).

Unter Einsatz des Glastrichters werden beide Proben mit je 100 mg (etwa zwei kleine Spatelspitzen eines Halbmikro-Spatels) Seesand versetzt, mit Gummistopfen verschlossen, viermal mäßig geschüttelt (ansonsten entstehen zu viele Luftblasen) und zur Beobachtung in den Reagenzglasständer gestellt.

In dem Reagenzglas mit Wasser beobachtet man praktisch sofort eine Sedimentation der Seesand-Partikel. Dahingegen dauert es bei der mit λ -Carrageenan stabilisierten Suspension mehr als eine Minute, bis sich die Partikel abgesetzt haben.

2.2.3 Gewinnung aus Rotalgen

Experiment 41: Gewinnung von Carrageenan aus *Chondrus crispus*, *Gigartina radula* und *Euचेuma cottonii*

Chemikalien

Getrocknete Rotalgen, z. B. *Chondrus crispus* („Carrageen conc., Irländisches Moos“, Firma Caesar & Loretz; in getrockneter Form als Hustentee-Zusatz in Apotheken erhältlich) bzw. *Gigartina radula* oder *Euचेuma cottonii* (Proben der Firma Pomosin), Natronlauge (c = 0,01 mol/L), 2-Propanol (F; R: 11, S: 7-16), Aceton (F; R: 11, S: 9-16-23.2-33), Paraffinöl, entionisiertes Wasser, Eis.

Geräte

Rundkolben (1 L, NS 29), Kristallisierschale (d = 19 cm), Intensivkühler (Mantellänge: l = 25 cm, NS 29), 3 Saugflaschen (1 L) mit passenden Gummimanschetten, 2 Bechergläser (1 x 1 L, hohe Form; 1 x 2 L, niedrige Form), 3 Büchnertrichter (1 x 12 cm; 2 x 15 cm Durchmesser), Vakuumexsikkator, Petrischale (d = 12 cm), 3 Glasstäbe, heizbarer Magnetrührer, Kontaktthermometer, 2 Rührfische (1 x 3 cm; 1 x 4 cm, dicke Form), Membranpumpe (komplett mit Woulfescher Flasche, Kühlfalle und Dewar), Stabthermometer, Hebebühne, Stativmaterial, Kühlwasserschläuche aus Gummi, 2 Schlauchklemmen, elektrische Kaffeemühle, Waage, Stoppuhr, Schere, Filtriergewebe (feiner Nesselstoff), mittelweitporiger Rundfilter (d = 11 cm).

Durchführung

Für den Versuch wird zunächst die in Abbildung 113 dargestellte Apparatur aufgebaut:

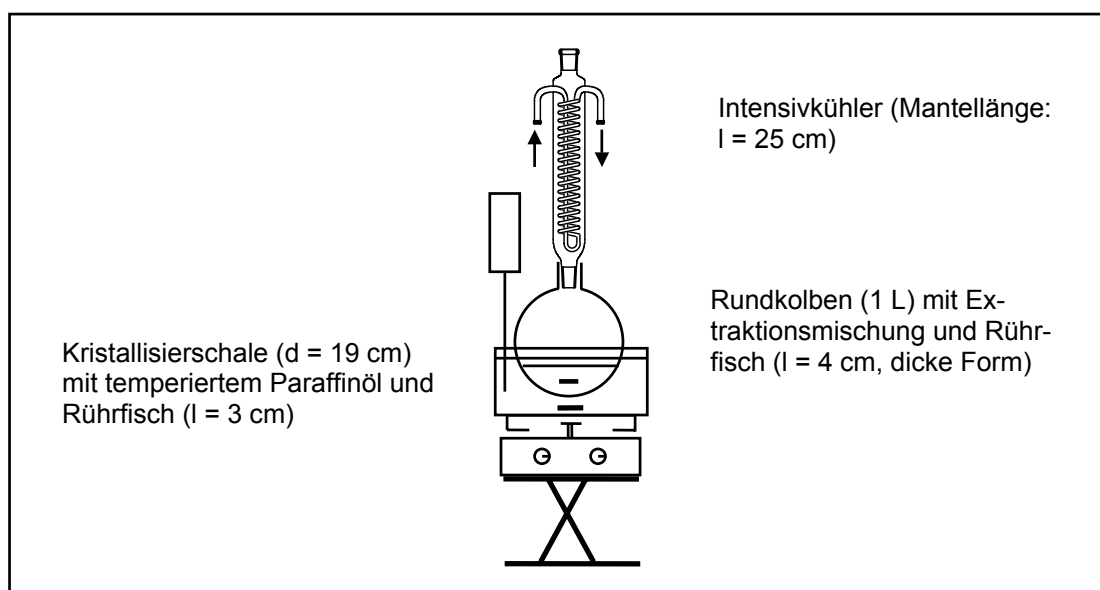


Abb. 113: Versuchsanordnung zur Extraktion von Carrageenan aus Rotalgen.

In Abhängigkeit von der eingesetzten Rotalgen-Spezies heizt man das Ölbad unter Rühren mit einem Rührfisch ($l = 3 \text{ cm}$) auf eine der in Tabelle 89 angegebenen Temperaturen vor. Nachdem sich eine konstante Badtemperatur eingestellt hat, wird der Rundkolben (1 L, NS 29) mit einem Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$, dicke Form) versehen und mit der für die entsprechende Algenart vorgesehenen Extraktionsmischung gefüllt.

Tab. 89: Reaktionsbedingungen und -ansätze für die Gewinnung von Carrageenan aus verschiedenen Rotalgen-Arten.

Verwendete Rotalge	ϑ (Ölbad) in °C	Zusammensetzung der Extraktionsansatzes		
		m (Algen) in g	Einsatzform	V ($\text{NaOH}_{(\text{aq})}$, $c = 0,01 \text{ mol/L}$) in mL
<i>Chondrus crispus</i>	125	5	Mit elektrischer Kaffeemühle fein gemahlen	300
<i>Gigartina radula</i>	125	5	Mit elektrischer Kaffeemühle fein gemahlen	300
<i>Euचेuma cottonii</i>	130	5	Mit Schere gewürfelt (Kantenlänge: ca. 3 mm)	300

Der Extraktionsansatz wird im Ölbad unter Rückfluss bei mittlerer Rührgeschwindigkeit zum Sieden erhitzt und dann 15 Minuten auf Siedetemperatur gehalten. Danach schaltet man die Heizung des Magnetrührers ab, entfernt das Ölbad und rührt den Ansatz noch weitere 15 Minuten.

In der Zwischenzeit werden 500 mL 2-Propanol nach der folgenden Methode eisgekühlt (vgl. Abbildung 114): Man füllt ein Becherglas (1 L, hohe Form) mit dem angegebenen Volumen des Alkohols und bringt es in ein Eisbett ein, welches aus einem mit Eis-Kochsalz-Kältemischung gefüllten Becherglas (2 L, niedrige Form) besteht. Das 2-

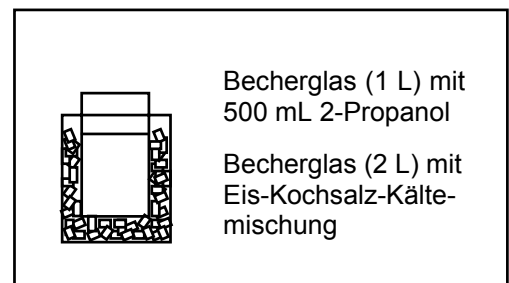


Abb. 114: Kühlung von 2-Propanol.

Propanol ist dann unter Temperaturkontrolle mittels Stabthermometer auf $\vartheta \approx -10 \text{ °C}$ abzukühlen.

Nach fünfzehnminütiger Rührzeit wird die noch heiße Extraktionsmischung über einen mit Filtriergewebe ausgelegten Büchnertrichter ($d = 15 \text{ cm}$) in eine Saugflasche (1 L) abgesaugt. Das erhaltene Filtrat wird zur Präzipitation des darin enthaltenen Carrageenans unter Einsatz eines Glasstabes in das eisgekühlte 2-Propanol eingerührt. Zur Vervollständigung der Fällung belässt man das Becherglas (1 L) weitere fünf Minuten im Eisbett. Dabei ist durch gelegentliches Rühren für eine gute Durchmischung zu sorgen.

Den Inhalt des Becherglases (1 L) saugt man anschließend über einen mit Filtriergewebe ausgelegten Büchnertrichter ($d = 15 \text{ cm}$) in eine Saugflasche (1 L) ab. Das als fester

Rückstand im Trichter zurückbleibende Carrageenan-Präzipitat wird in einen Büchnertrichter ($d = 12 \text{ cm}$) mit mittelweitporigem Filterpapier überführt.

Durch Behandlung mit 200 mL 2-Propanol sowie 400 mL Aceton erfolgt nun eine partielle Dehydratisierung des noch stark wasserhaltigen Präzipitats. Dazu wäscht man das ausgefällte Carrageenan nach Aufsetzen des Büchnertrichters auf eine Saugflasche (1 L) unter Absaugen mit der Membranpumpe zunächst mit zwei 100-mL-Portionen 2-Propanol und anschließend mit vier 100-mL-Portionen Aceton. Dabei wird das relativ kompakte Carrageenan-Präzipitat mit zwei Glasstäben zerfasert.

Um eine möglichst vollständige Trocknung der gewaschenen Carrageenan-Fasern herbeizuführen, überführt man diese zunächst aus dem Büchnertrichter in das vorher ausgewogene Unterteil einer Petrischale ($d = 12 \text{ cm}$) und wägt erneut. Das Carrageenan wird dann so lange im evakuierten Exsikkator bei eingeschalteter Membranpumpe getrocknet, bis sich Massenkonstanz eingestellt hat.

Ergebnisse

Vgl. Kapitel 3.4.4 des Theoretischen Teils.

Experiment 42: Vereinfachte Isolierung von Rohcarrageenan aus <i>Chondrus crispus</i>
--

Chemikalien

Chondrus crispus (z. B. „Carrageen conc. (Irländisches Moos)“, Firma Caesar & Loretz; in getrockneter Form als Hustentee-Zusatz in Apotheken erhältlich), Natronlauge ($c = 0,01 \text{ mol/L}$) (**Xi**; R: 36/38; S: 26), Kaliumchlorid-Lösung ($w = 0,10$), 2-Propanol (**F, Xi**; R: 11-36-67; S: 7-16-24/25-26), Eis, Kochsalz, entionisiertes Wasser.

Geräte

4 Bechergläser (3 x 250 mL, niedrige Form; 1 x 1 L, hohe Form), 2 Kristallisierschalen ($d = 14 \text{ cm}$), 4 Messzylinder (1 x 50 mL; 1 x 100 mL; 2 x 250 mL), Uhrglas ($d = 10 \text{ cm}$), 2 Glasstäbe, Teesieb aus Baumwollstoff, Magnetrührer (heizbar), Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$), Waage, Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen.

Durchführung

In einem Becherglas (250 mL, niedrige Form) werden 1,5 g *Chondrus crispus* eingewogen. Nach Versetzen mit 100 mL Natronlauge ($c = 0,01 \text{ mol/L}$) erhitzt man die Mischung unter Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) zum Sieden (Temperatureinstellung: $150 \text{ }^\circ\text{C}$). Das Becherglas wird dabei mit einem Uhrglas ($d = 10 \text{ cm}$) bedeckt.

Anschließend rührt man noch weitere 15 Minuten bei abgestellter Heizung. Sollte die Schaumentwicklung in der Mischung während dieser Zeit zu stark sein, ist das Uhrglas kurzzeitig abzunehmen.

Der Inhalt des Becherglases wird noch heiß durch ein Teesieb aus Baumwollstoff in ein Becherglas (1L, hohe Form) abfiltriert. Das Filtrat muss vor seiner Weiterverwendung 20 Minuten abkühlen.

Währenddessen kühlt man 200 mL KCl-Lösung ($w = 0,10$) und das gleiche Volumen 2-Propanol 20 Minuten vor, indem man die beiden Flüssigkeiten jeweils in einem Becherglas (250 mL, niedrige Form) in Kristallisierschalen mit Eis-Kochsalz-Kältemischung einbringt.

Zur Demonstration der Gelierfähigkeit der isolierten κ - und ι -Carrageenane lässt man 20 mL des abgekühlten Filtrats in das Becherglas mit KCl-Lösung ($w = 0,10$) einfließen. Nach kurzer Zeit hat sich ein fadenförmiges Gel gebildet.

Der Rest des Filtrats wird unter Rühren mit einem Glasstab in dünnem Strahl in den vorgekühlten Alkohol eingebracht. Hier bildet sich ein aus λ -, κ - und ι -Carrageenan bestehendes Präzipitat.

2.2.4 Ausgewählte Anwendungsmöglichkeiten

2.2.4.1 Lebensmittelindustrie

Experiment 43: Stabilisierung von Salatdressings mit Öl und Kräutern durch λ -Carrageenan

Chemikalien

Wässrige Lösung eines nicht standardisierten λ -Carrageenans (z. B. „JEW 040“, Firma Eurogum) (zur Herstellung vgl. Experiment 37 a)), gefriergetrocknete Salatkräuter („Kräutaan“, Firma Lidl), Speiseöl, entionisiertes Wasser.

Geräte

2 Weithalslerlenmeyerkolben (1 x 50 mL; 1 x 100 mL), 3 Messzylinder (2 x 25 mL; 1 x 50 mL), 2 Reagenzgläser (l = 16 cm, d = 1,6 cm) mit passenden Gummistopfen, Reagenzglasständer, 2 Glasstäbe, Magnetrührer (heizbar), 2 Rührfische (1 x 3 cm, 1 x 4 cm), Spritze (1 mL; ohne Kanüle), Mörser mit Pistill, Waage, Magnetstab zum Entfernen von Rührfischen.

Durchführung

In einem Weithalslerlenmeyerkolben (100 mL) setzt man 50 mL λ -Carrageenan-Lösung ($\rho^* = 20$ g/L) nach der in Experiment 37 a) beschriebenen Arbeitsvorschrift an.

Die gefriergetrockneten Salatkräuter müssen in einer Öl-Wasser-Mischung quellen, bevor sie für den eigentlichen Versuch verwandt werden können. Zu diesem Zweck wiegt man 3 g der im Mörser leicht zerkleinerten Kräuter in einem Weithalslerlenmeyerkolben (50 mL) ein, versetzt mit 25 mL Salatöl und dem gleichen Volumen entionisierten Wassers und rührt etwa eineinhalb Stunden mittels Magnetrührer und Rührfisch (l = 3 cm).

Um die emulsions- und suspensionsstabilisierende Wirkung von λ -Carrageenan zu demonstrieren, werden zwei Reagenzgläser bis zu einer Höhe von 4 cm mit

- entionisiertem Wasser bzw.
- λ -Carrageenan-Sol ($\rho^* = 20$ g/L).

gefüllt. Unter Einsatz der Spritze entnimmt man der Salatkräuter-Öl-Wasser-Mischung im 50-mL-Weithalslerlenmeyerkolben zwei 1-mL-Portionen und gibt sie in die vorbereiteten Reagenzgläser. Die Mischung muss während der Entnahme weiterhin gerührt werden, da ansonsten eine Phasentrennung einsetzt.

Die mit Salatkräuter-Öl-Wasser-Mischung versehenen Reagenzgläser werden mit Stopfen verschlossen, zehn Sekunden kräftig geschüttelt und zur Beobachtung im Reagenzglasgestell platziert.

In dem Ansatz mit entionisiertem Wasser ist das Einsetzen der Phasentrennung bereits nach ca. 30 – 60 Sekunden gut erkennbar. Nach etwa fünf Minuten hat sich die Öl-Phase, die einen Großteil der suspendierten Kräuter enthält, sehr deutlich von der Wasser-Phase abgesetzt. Die grünliche Farbe der Wasser-Phase wird durch das aus den zermörserten Kräutern freigesetzte Chlorophyll verursacht.

Dahingegen ist in dem mit λ -Carrageenan stabilisierten Salatdressing auch nach 20 – 30 Minuten noch keine Entmischung zu beobachten. In Abhängigkeit von den Eigenschaften des eingesetzten Algenpolysaccharids und der Größe der suspendierten Kräuter-Partikel sind die Dressings sogar noch längere Zeit stabil.

Experiment 44: Nachweis von Carrageenan in Salatdressing, Tortenguss und Instant-Götterspeise
--

a) Salatdressing

Vorbemerkung

Es werden zwei zeitlich und apparativ unterschiedlich aufwändige Vorgehensweisen zur Isolierung des Carrageenans aus Salatdressing beschrieben:

- **Alternative 1** bietet die Möglichkeit, das im Salatdressing enthaltene Algenpolysaccharid nicht nur auszufällen, sondern auch zu reinigen und zu trocknen. Man erhält Carrageenan-Fasern, die sich dann für analytische Nachweisreaktionen weiterverwenden lassen. Benötigt werden für diese Variante allerdings eine Membranpumpe und ein evakuierbarer Exsiccator.
- **Alternative 2** arbeitet mit sehr einfachen Geräten und lässt sich wesentlich schneller durchführen. Sie ist somit für den Einsatz in der Schule eher geeignet. Ein Nachteil besteht allerdings darin, dass das bei der Präzipitation erhaltene Carrageenan noch lösungsmittelhaltig ist, da es nur kurze Zeit an der Luft getrocknet wird.

Alternative 1

Chemikalien

Carrageenanhaltiges Salatdressing (z. B. „Salatfix Dressing kräuterwürzig (ohne Öl)“, Firma Kühne), nicht standardisiertes ι -Carrageenan (z. B. „S 1495“, Firma Shemberg Europe), wässrige Methylenblau-Lösung ($\rho^* = 0,08 \text{ g/L}$), 2-Propanol (F; R: 11, S: 7-16), Aceton (F; R: 11, S: 9-16-23.2-33), Natriumchlorid, entionisiertes Wasser, Eis.

Geräte

2 Weithalslerlenmeyerkolben (100 mL), 2 Bechergläser (1 x 600 mL, hohe Form; 1 x 1 L, niedrige Form), 2 Saugflaschen (1 x 250 mL; 1 x 1 L; jeweils mit Gummimanschette), Petrischale ($d = 12 \text{ cm}$), 3 Reagenzgläser für Hand- oder Demonstrationsversuche mit passenden Gummistopfen, Reagenzglasständer, 6 Glasstäbe, 2 Büchnertrichter ($d = 12 \text{ cm}$), heizbarer Magnetrührer, 2 Rührfische ($l = 4 \text{ cm}$), Membranpumpe (komplett mit Woulfescher Flasche, Kühlfalle und Dewar), Stabthermometer, 2 Standardrundfilter ($d = 11 \text{ cm}$), Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen.

Durchführung

Zunächst sind 300 mL 2-Propanol in einem Eisbett auf $\vartheta \approx -10 \text{ °C}$ abzukühlen. Dazu bringt man ein Becherglas (600 mL, hohe Form) mit dem genannten Alkohol-Volumen in ein Becherglas (1 L, niedrige Form) ein, dessen Boden mit Eis-Kochsalz-Mischung bedeckt ist. Der seitlich verbleibende Raum wird anschließend ebenfalls mit der Kältemischung gefüllt (zur Anordnung der Geräte vgl. Experiment 41).

In der Zwischenzeit saugt man 100 g carrageenanhaltiges Salatdressing zur Entfernung der suspendierten Kräuter über einen mit Standardfilterpapier ausgelegten Büchnertrichter ($d = 12 \text{ cm}$) in eine Saugflasche (250 mL) ab.

Zur Ausfällung des Carrageenans wird das erhaltene Filtrat unter Zuhilfenahme eines Glasstabes in das eisgekühlte 2-Propanol eingerührt und verbleibt darin fünf Minuten. Dabei wird durch gelegentliches Rühren mit einem Glasstab für eine gute Durchmischung des Präzipitationsbades gesorgt.

Um das Carrageenan-Präzipitat vom Fällungsbad abzutrennen, filtriert man anschließend unter Verwendung der Membranpumpe über einen mit Standardfilterpapier ausgelegten Büchnertrichter ($d = 12 \text{ cm}$) in eine Saugflasche (1 L) ab. Das erhaltene Carrageenan wird zur partiellen Dehydratisierung nacheinander mit jeweils zwei 100-mL-Portionen 2-Propanol sowie Aceton gewaschen. Dabei zerfasert man das zunächst relativ kompakte Präzipitat unter Einsatz von zwei Glasstäben.

Die so behandelten Carrageenan-Fasern werden in das vorher ausgewogene Unterteil einer Petrischale ($d = 12 \text{ cm}$) überführt. Nach erneutem Wägen trocknet man im Vakuumexsikkator bei eingeschalteter Membranpumpe bis zur Massenkonstanz.

200 mg des getrockneten Carrageenans werden in einem Weithals-erlenmeyerkolben (100 mL) eingewogen und in 100 mL entionisiertem Wasser suspendiert. Die Suspension erwärmt man anschließend unter Rühren mittels Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) und Magnetrührer auf $\vartheta = 80 \text{ }^\circ\text{C}$ und rührt so lange weiter, bis das Carrageenan vollständig in Lösung gegangen ist.

Das auf Zimmertemperatur abgekühlte Carrageenan-Sol wird nach Entfernung des Rührfisches mit entionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 mL verdünnt und abschließend mit Hilfe eines Glasstabes gründlich durchmischt.

Gemäß der im Vorangehenden beschriebenen Methode wird in einem zweiten Weithals-erlenmeyerkolben (100 mL) zusätzlich eine gleichkonzentrierte wässrige Lösung von nicht standardisiertem ι -Carrageenan ($\rho^* = 2 \text{ g/L}$) angesetzt.

Soll die Durchführung des Carrageenan-Nachweises in Form eines Handversuchs erfolgen, so füllt man in drei Reagenzgläser zunächst jeweils 7,5 mL

- des Sols, welches mit dem aus dem Salatdressing isolierten Carrageenan hergestellt wurde,
- ι -Carrageenan-Lösung ($\rho^* = 2 \text{ g/L}$) bzw.
- entionisiertes Wasser.

Nach Versetzen mit je 1 mL Methylenblau-Lösung ($\rho^* = 0,08 \text{ g/L}$) verschließt man alle Reagenzgläser mit Gummistopfen und vermischt gründlich durch Schütteln. Während in den beiden carrageenanhaltigen Lösungen blauviolette Färbungen auftreten, weist die Probe mit entionisiertem Wasser die typisch türkisblaue Farbe einer verdünnten wässrigen Methylenblaulösung auf.

Bei Durchführung des Carrageenan-Nachweises als Demonstrationsexperiment versetzt man jeweils 60 mL der oben aufgeführten Proben mit 8 mL Methylenblau-Lösung ($\rho^* = 0,08 \text{ g/L}$) und verfährt ansonsten wie im Vorangehenden beschrieben.

Ergebnisse

Vgl. Kapitel 3.5.2.2 des Theoretischen Teils.

Alternative 2

Chemikalien

Carrageenanhaltiges Salatdressing („Salatfix Dressing kräuterwürzig (ohne Öl)“, Firma Kühne), nicht standardisiertes ι -Carrageenan („S 1495“, Firma Eurogum), wässrige Methylblau-Lösung ($\rho^* = 0,08 \text{ g/L}$), 2-Propanol (**F, Xi**; R: 11-36-67, S: 7-16-24/ 25-26), Aceton (**F, Xi**; R: 11-36-66-67, S: 9-16-26), Natriumchlorid, Eis, entionisiertes Wasser.

Geräte

2 Weithals-erlenmeyerkolben (100 mL), 4 Bechergläser (1 x 600 mL, hohe Form; 1 x 1 L, hohe Form, 2 x 1 L, niedrige Form), 3 Messzylinder (2 x 100 mL; 1 x 250 mL), 3 Reagenzgläser (l = 16 cm, d = 1,6 cm) mit passenden Gummistopfen, Reagenzglasständer, heizbarer Magnetrührer, 2 Rührfische (l = 4 cm), 3 Glasstäbe, Stabthermometer, Teesieb aus Baumwolle, Mehrweg-Kaffeefilter aus Edestahlgewebe, Spritzen (1 x 1 mL, 3 x 10 mL; jeweils ohne Kanülen) Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen, Waage.

Durchführung

Wie in Alternative 1 beschrieben, werden zunächst 300 mL 2-Propanol in einem Eisbett auf $\vartheta \approx -10 \text{ °C}$ abgekühlt.

In der Zwischenzeit filtriert man 100 mL carrageenanhaltiges Salatdressing zur Entfernung der suspendierten Kräuter durch ein Teesieb aus Baumwolle, das auf dem Rand eines Becherglases (1L, hohe Form) aufliegt. Um den Filtrationsvorgang zu vervollständigen, wird das Teesieb am Ende ausgedrückt.

Zur Ausfällung des Carrageenans wird das erhaltene Filtrat unter Zuhilfenahme eines Glasstabes in das eisgekühlte 2-Propanol eingerührt und verbleibt darin fünf Minuten. Dabei wird durch gelegentliches Rühren mit einem Glasstab für eine gute Durchmischung des Präzipitationsbades gesorgt.

Um das Carrageenan-Präzipitat vom Fällungsbad abzutrennen, filtriert man anschließend durch ein Mehrweg-Kaffeefilter aus Edestahlgewebe in ein Becherglas (1L, niedrige Form) ab. Das erhaltene Carrageenan wird zur partiellen Dehydratisierung nacheinander mit jeweils vier 50-mL-Portionen 2-Propanol sowie Aceton gewaschen. Dabei zerfasert man das zunächst relativ kompakte Präzipitat unter Einsatz von zwei Glasstäben und drückt es anschließend gründlich aus.

Nachdem das isolierte Carrageenan 15 Minuten an der Luft getrocknet ist, wird es in einem 100-mL-Weithals-erlenmeyerkolben in 100 mL entionisiertem Wasser suspendiert.

Die Suspension erwärmt man anschließend unter Rühren mittels Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) und Magnetrührer auf $\vartheta = 80 \text{ °C}$ und rührt so lange weiter, bis das Algenpolysaccharid vollständig in Lösung gegangen ist.

In dem auf Raumtemperatur abgekühlten Sol sowie einer auf analoge Weise angesetzten Vergleichslösung von nicht standardisiertem ι -Carrageenan ($\rho^* \approx 2 \text{ g/L}$) kann das Algenpolysaccharid durch Reaktion mit Methyleneblau-Lösung ($\rho^* = 0,08 \text{ g/L}$) nachgewiesen werden. Dabei geht man wie in Alternative 1 beschrieben vor.

b) Tortenguss

Chemikalien

Carrageenanhaltiges Tortenguss-Pulver ohne andere Geliermittel mit Polyelektrolyt-Charakter („Tortenguss klar“ bzw. „Gezuckerter Tortenguss klar“, Firma Dr. Oetker), nicht standardisiertes κ -Carrageenan („SPF 042“, Firma Eurogum), Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat (Seignette-Salz), wässrige Methyleneblau-Lösung ($\rho^* = 0,08 \text{ g/L}$), entionisiertes Wasser.

Geräte

3 Weithalslerlenmeyerkolben (100 mL), 4 Reagenzgläser ($l = 16 \text{ cm}$, $d = 1,6 \text{ cm}$) mit passenden Gummistopfen und Reagenzglasgestell, 5 Spritzen (1 x 1 mL, 4 x 10 mL; jeweils ohne Kanülen), heizbarer Magnetrührer, 3 Rührfische ($l = 4 \text{ cm}$), Waage, Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen.

Durchführung

In einem Weithalslerlenmeyerkolben (100 mL) suspendiert man 0,5 g Tortenguss-Pulver in 100 mL entionisiertem Wasser. Die Suspension wird auf der Heizplatte des Magnetrührers unter Rühren mittels Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) zum Sieden erhitzt und nach Abschalten der Heizung so lange weitergerührt, bis alles gelöst ist. Durch die im Tortenguss enthaltene Stärke erscheint die Lösung immer noch leicht trüb.

Anschließend stellt man analog zu der in Versuchsteil a) beschriebenen Methode 100 mL κ -Carrageenan-Lösung ($\rho^* \approx 2 \text{ g/L}$) in einem Weithalslerlenmeyerkolben (100 mL) her. Zusätzlich wird noch ein Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat enthaltendes κ -Carrageenan-Sol angesetzt. Dazu werden in einem Weithalslerlenmeyerkolben (100 mL) 200 mg κ -Carrageenan und 300 mg Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat eingewogen und in 100 mL entionisiertem Wasser suspendiert.

Die resultierende Suspension erwärmt man anschließend unter Rühren mittels Rührfisch ($l = 4 \text{ cm}$) und Magnetrührer auf $\vartheta = 80 \text{ °C}$ und rührt so lange weiter, bis das Carrageenan vollständig in Lösung gegangen ist.

Die Massenkonzentrationen der beiden Sole entsprechen nicht exakt den angegebenen Werten, da das Erwärmen der Lösungen mit geringen Volumenverlusten verbunden ist. Dies spielt jedoch für den durchzuführenden qualitativen Nachweis keine Rolle.

Um Störungen der Nachweisreaktion zu verhindern, lässt man die Tortenguss-Lösung und die beiden Carrageenan-Sole vor ihrer Weiterverwendung auf Raumtemperatur abkühlen.

Für den Carrageenan-Nachweis werden drei Reagenzgläser mit je 7,5 mL

- der hergestellten Tortenguss-Lösung,
- κ -Carrageenan-Lösung ($\rho^* \approx 2 \text{ g/L}$),
- κ -Carrageenan-Sol ($\rho^* \approx 2 \text{ g/L}$), das zusätzlich Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat in einer Massenkonzentration von $\rho^* \approx 3 \text{ g/L}$ enthält, bzw.
- entionisiertem Wasser

gefüllt und jeweils mit 1 mL Methylenblau-Lösung ($\rho^* = 0,08 \text{ g/L}$) versetzt. Nach Aufsetzen der Gummistopfen durchmischt man die Ansätze durch Schütteln.

In den Reagenzgläsern mit der Tortenguss-Lösung sowie in den als Blindproben eingesetzten κ -Carrageenan-Lösungen treten blauviolette Färbungen auf. Dahingegen ist in der Probe mit entionisiertem Wasser lediglich die typisch türkisblaue Farbe einer verdünnten wässrigen Methylenblau-Lösung erkennbar.

c) Instant-Götterspeise

Chemikalien

Instant-Götterspeise („Instant-Götterspeise Kirsch-Geschmack“ oder „Instant-Götterspeise Waldmeister-Geschmack“, Firma Dr. Oetker), Kaliumchlorid-Lösung ($\rho^* = 150 \text{ g/L}$), Ethanol (**F**; R: 11, S: 7-11), Ethanol (1 : 1), Aceton (**F**, **Xi**; R: 11-36-66-67, S: 9-16-26), wässrige Methylenblau-Lösung ($\rho^* = 0,08 \text{ g/L}$), nicht standardisiertes κ - oder ι -Carrageenan („SPF 042“ oder „S 1495“, Firma Eurogum), Natriumchlorid, Eis, entionisiertes Wasser.

Geräte

4 Bechergläser (1 x 100 mL; 2 x 250 mL, niedrige Form; 1 x 1 L, niedrige Form), 3 Weithalslerlenmeyerkolben (2 x 100 mL; 1 x 1 L), Kristallisierschale (d = 19 cm), Petrischale (d = 14 cm), Uhrglas (d = 10 cm), 3 Messzylinder (1 x 100 mL; 2 x 250 mL), Schnelllauftrichter (d = 11 cm), 2 Faltenfilter (d = 24 cm), Rundfilter (d = 12,5 cm), 3 Glasstäbe, 4 Reagenzgläser (l = 16 cm, d = 1,6 cm) mit passendem Gummistopfen, Reagenzglasständer, Magnetrührer (heizbar), 4 Rührfische (l = 4 cm), 3 Spritzen (1 x 1 mL, 2 x 10 mL; jeweils ohne Kanülen), Gummiwischer, Stabthermometer, Magnetstab zum Entfernen von Rührfischen, Waage.

Durchführung

Zunächst werden 400 mL KCl-Lösung ($\rho^* = 150 \text{ g/L}$) auf eine Temperatur von $\vartheta = 0 - 1 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgekühlt. Dazu füllt man die Lösung in ein Becherglas (1 L, niedrige Form) und stellt dieses in eine Kristallisierschale (d = 19 cm) mit Eis-Kochsalz-Kältemischung. Der Abkühlvorgang dauert etwa 15 Minuten.

In der Zwischenzeit werden in einem Becherglas (250 mL, niedrige Form) 80 mL entionisiertes Wasser mit Hilfe eines Magnetrührers und eines Rührfisches (l = 4 cm) zum Sieden erhitzt. Dabei wird das Becherglas mit einem Uhrglas (d = 10 cm) abgedeckt, um Verdunstungsverluste zu vermeiden und den Siedevorgang zu beschleunigen. Nach Entfernen des Rührfisches gießt man das siedende Wasser in ein Becherglas (250 mL, niedrige Form), in das zuvor 20 g Götterspeise-Pulver eingewogen wurden. Damit Verbrennungen vermieden werden, umfasst man das heiße Becherglas vorsichtshalber mit einem Handtuch.

Die resultierende Mischung wird zunächst gründlich mit einem Glasstab verrührt und anschließend zwei Minuten bei abgeschalteter Heizung unter Einsatz des Magnetrührers und des Rührfisches (l = 4 cm) weitergerührt.

Die so hergestellte Götterspeisen-Lösung bringt man unter Rühren mit einem Glasstab in die vorgekühlte KCl-Lösung ein. Es fällt ein flockiges, mit Farbstoffen verunreinigtes Carrageenan-Gel aus, das man noch weitere fünf Minuten aushärten lässt. Um eine gute Durchmischung des Gelierbades zu gewährleisten, wird es gelegentlich mit einem Glasstab umgerührt. Außerdem sollte das Becherglas während der Aushärtezeit in der Kristallisierschale mit Eis-Kochsalz-Mischung belassen werden, damit die Temperatur genügend niedrig bleibt.

Der Inhalt des Becherglases (1 L, niedrige Form) wird unter Einsatz eines Schnelllauftrichters (d = 11 cm) über einen Faltenfilter (d = 24 cm) in einen Weithalslerlenmeyerkolben (1 L) oder ein Becherglas (1 L, hohe Form) abfiltriert.

Das im Schnellauftrichter verbleibende Carrageenan-Gel wird zur Entfernung der Salze, Farb- und Aromastoffe zunächst portionsweise mit einer Mischung aus 500 mL Ethanol und 500 mL Wasser (= Ethanol (1 : 1)) gespült. Damit die am Faltenfilter adsorbierten Farbstoffe nicht durch das Lösungsmittelgemisch herausgelöst werden und dadurch zu Verunreinigungen führen, überführt man das Carrageenan-Gel vor dem Spülvorgang unter Einsatz eines Gummiwischers in einen neuen Faltenfilter gleicher Größe.

Abschließend wird das gereinigte Carrageenan-Gel zur Entwässerung nacheinander noch in kleinen Portionen mit 200 mL Ethanol und 200 mL Aceton gespült. Um die Oberfläche zu vergrößern, zerfasert man das Gel dabei jeweils mit zwei Glasstäben.

Nachdem das isolierte Carrageenan 15 Minuten in einer Petrischalenhälfte ($d = 14$ cm) auf einem Rundfilter ($d = 12,5$ cm) getrocknet wurde, suspendiert man es in einem Weithalslerlenmeyerkolben (100 mL) in 70 mL entionisiertem Wasser. Unter Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 4$ cm) erwärmt man die resultierende Suspension auf $\vartheta = 80$ °C und rührt nach Abschalten der Heizung so lange weiter, bis sich das Algenpolysaccharid vollständig gelöst hat.

In einem zweiten Weithalslerlenmeyerkolben (100 mL) wird als Vergleichsprobe auf analoge Weise eine Lösung von 200 mg nicht standardisiertem κ - oder ι -Carrageenan in 100 mL entionisiertem Wasser angesetzt. Die Massenkonzentration des so hergestellten Algenpolysaccharid-Sols beträgt durch Verdunstungsverluste allerdings nur ungefähr $\rho^* = 2$ g/L. Wie bereits in den Versuchsteilen a) und b) angedeutet, spielt dies aber für den Ausgang des Experimentes keine Rolle.

Um Störungen der Nachweisreaktion von Carrageenan mit Methylblau-Lösung ($\rho^* = 0,08$ g/L) zu vermeiden, werden die beiden Algenpolysaccharid-Sole vor ihrer Weiterverwendung auf Raumtemperatur abgekühlt.

Für die Durchführung des Carrageenan-Nachweises in Form eines Handversuches füllt man zunächst drei Reagenzgläser mit je 7,5 mL

- des Sols, welches mit dem aus Götterspeisen-Pulver isolierten κ -Carrageenan hergestellt wurde,
- ι - oder κ -Carrageenan-Lösung ($\rho^* \approx 2$ g/L) bzw.
- entionisiertem Wasser.

und setzt zu jeder Probe 2 mL Methylblau-Lösung ($\rho^* = 0,08$ g/L) hinzu. Nach Verschließen mit Gummistopfen werden alle drei Ansätze gründlich vermischt.

In den beiden erstgenannten Ansätzen tritt jeweils die für den positiven Carrageenan-Nachweis charakteristische blauviolette Färbung auf. Dahingegen beobachtet man in der Probe mit entionisiertem Wasser lediglich einen Verdünnungseffekt.

Experiment 45: Herstellung von Fruchtgummis mit Carrageenan als Geliermittel**Chemikalien**

Nicht standardisiertes κ -Carrageenan („SPF 042“, Firma Eurogum), Waldmeister-Sirup („Grundstoff mit Waldmeister-Geschmack für die Herstellung künstlicher Getränke“, Firma Goebber), Saccharose, Natriumcitrat-Dihydrat, Citronensäure (Xi; R: 36, S: 24/25), entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- Natriumcitrat-Dihydrat-Lösung:
1 g des Salzes wird in 15 mL entionisiertem Wasser gelöst;
- Citronensäure-Lösung (w = 0,50).

Geräte

Becherglas (250 mL), Messzylinder (100 mL), Rührfisch (l = 5 cm), heizbarer Magnetrührer, Stabthermometer, Haushaltssieb (d = 6 cm), kleine Plastikformen (z. B. Eiswürfelbereiter mit Tiermotiven), Waage, Spatel.

Durchführung

Das 250-mL-Becherglas wird mit 75 mL Waldmeister-Sirup gefüllt. In die mittels Magnetrührer und Rührfisch (l = 5 cm) gerührte Flüssigkeit siebt man mit dem Haushaltssieb (d = 6 cm) langsam und in kleinen Portionen 2,5 g κ -Carrageenan ein. Nach Zufügen von der Natriumcitrat-Dihydrat-Lösung (s. o.) wird die Mischung unter Rühren bis zum Sieden erhitzt.

Nun stellt man die Heizung des Magnetrührers ab und versetzt die gerührte Mischung nacheinander mit 15 g Saccharose und 1 mL Citronensäure-Lösung (w = 0,50). Die Fruchtgummi-Grundmasse wird so lange weiter mit dem Magnetrührer durchmischt, bis sich die Carrageenan-Klumpen aufgelöst haben. Anschließend gießt man die noch heiße Mischung in die Plastikformen.

Nach einer Abkühlzeit von 10 – 15 Minuten sind die Fruchtgummis ausgehärtet und lassen sich leicht aus der Form lösen. Das erhaltene Carrageenan-Gel ist klebrig und zeigt leichte Synäreseerscheinungen.

Dies ist einer der Gründe dafür, dass in der Industrie hochspezialisierte Carrageenane für die Verwendung in gummiartigen Süßwaren entwickelt werden müssen.

Experiment 46: Demonstration der pH-abhängigen Reaktion von κ -Carrageenan mit Proteinen am Beispiel von Casein**Chemikalien**

Ampulle mit Natronlauge zur Herstellung von 1 L Maßlösung ($c = 0,01 \text{ mol/L}$), (Xi; R: 36/38, S: 26), Ampulle mit Salzsäure zur Herstellung von 1 L Maßlösung ($c = 0,1 \text{ mol/L}$), Casein („Casein nach Hammarsten“, Firma Merck, Best.-Nr.: 1.02242), nicht standardisiertes κ -Carrageenan („SPF 042“, Firma Shemberg Europe), entionisiertes Wasser.

Anzusetzende Lösungen

- NaOH-Maßlösung ($c = 0,01 \text{ mol/L}$),
- Salzsäure-Maßlösung ($c = 0,05 \text{ mol/L}$),
- κ -Carrageenan-Sol ($\rho^* = 1 \text{ g/L}$) (zur Herstellung vgl. Versuchsdurchführung).

Geräte

Erlenmeyerschliiffkolben (250 mL, NS 29) mit Schliiffstopfen (NS 29), 3 Bechergläser (2 x 100 mL, niedrige Form; 1 x 250 mL, hohe Form), Bürette (50 mL), Saugflasche (1 L), 3 Vollpipetten (20 mL), Glasstab, Magnetrührer (heizbar), 4 Rührfische (2 x 2 cm; 2 x 3 cm Länge), pH-Meter, Büchnertrichter ($d = 12 \text{ cm}$), Rundfilter ($d = 11 \text{ cm}$), Membranpumpe (komplett mit Woulfescher Flasche, Kühlfalle und Dewar), Stabthermometer, Stativmaterial, Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen, Aluminiumband (NS 29), Sicherungsfeder, Waage, Spatel, Kühlschrank.

Durchführung

Einen Tag vor der Durchführung des eigentlichen Experimentes ist eine Casein-Suspension vorzubereiten: Dazu werden in einen Erlenmeyerschliiffkolben (250 mL, NS 29) 2 g Casein nach Hammarsten eingewogen und unter Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 3 \text{ cm}$) in 100 mL Natronlauge ($c = 0,01 \text{ mol/L}$) suspendiert. Nach einer Rührzeit von 30 Minuten verschließt man den Kolben mit einem Schliiffstopfen, sichert mit einer Feder und bewahrt die Suspension über Nacht im Kühlschrank auf. Am folgenden Tag wird über einen mit mittelweitporigem Filterpapier ausgelegten Büchnertrichter ($d = 12 \text{ cm}$) vom ungelösten Rückstand abgesaugt. Der pH-Wert des erhaltenen Caseinat-Sols liegt etwa im neutralen Bereich ($\text{pH} \approx 6, 7 - 7,0$).

Die Herstellung von 50 mL des benötigten Carrageenan-Sols ($\rho^* = 1 \text{ g/L}$) erfolgt nach der in Experiment 37 a) beschriebenen Methode in einem Becherglas (250 mL) mit Rührfisch ($l = 3 \text{ cm}$).

Zur Demonstration der Reaktion von κ -Carrageenan mit Casein pipettiert man in die beiden 100-mL-Bechergläser jeweils 20 mL der hergestellten Caseinat-Lösung. Eine Probe wird anschließend mit 20 mL entionisiertem Wasser, die zweite mit 20 mL κ -Carrageenan-Sol ($\rho^* = 1 \text{ g/L}$) versetzt. Unter Verfolgung der Änderung des pH-Wertes mit einem pH-Meter werden die beiden Proben nacheinander jeweils mit insgesamt 20 mL verdünnter Salzsäurelösung ($c = 0,05 \text{ mol/L}$) aus einer Bürette (50 mL) versetzt. Die Säurezugabe erfolgt in 0,5-mL-Schritten unter kontinuierlichem Rühren mittels Magnetrührer und Rührfisch ($l = 2 \text{ cm}$).

Ergebnisse

In Abbildung 115 werden die bei der Titration erhaltenen Messwerte für die Ansätze mit und ohne Carrageenan graphisch dargestellt:

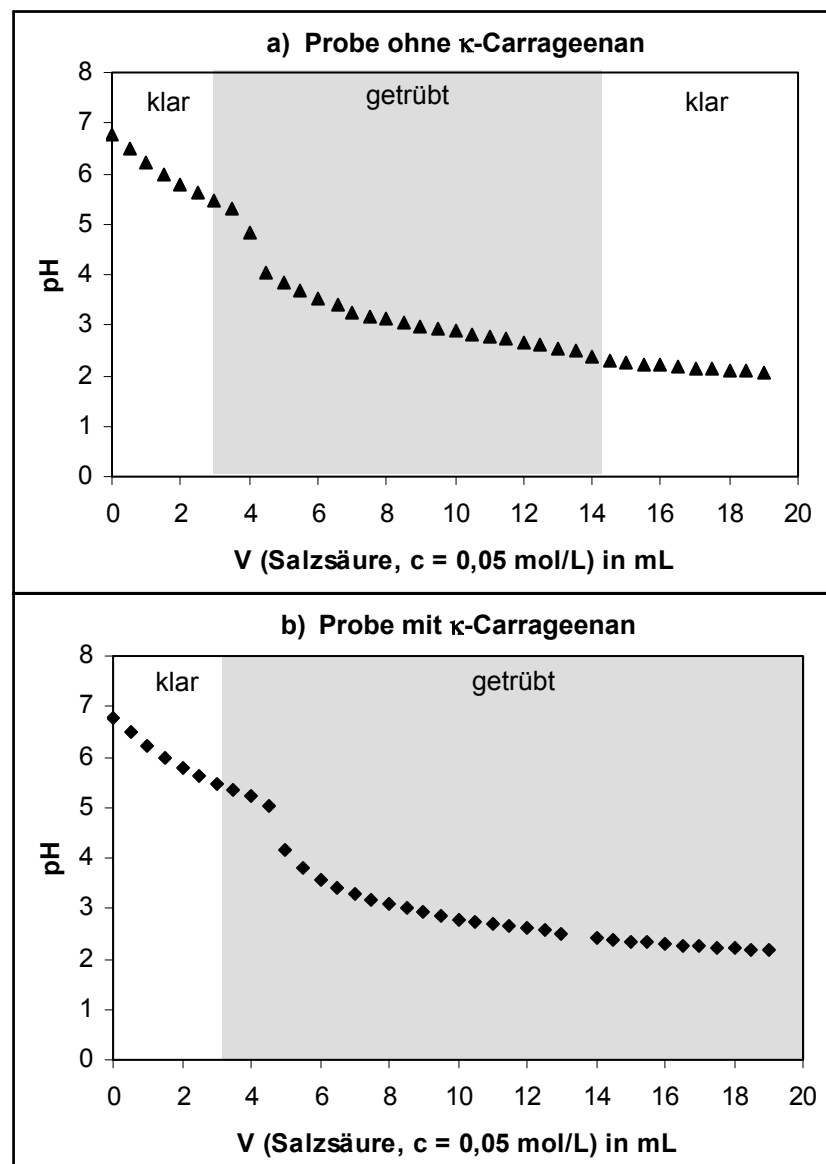


Abb. 115: pH-Wert und Löslichkeitsverhältnisse in einem Caseinat-Sol mit und ohne κ -Carrageenan-Zusatz in Abhängigkeit vom zugesetzten Volumen an Salzsäure ($c = 0,05 \text{ mol/L}$).

Wie ersichtlich, tritt in beiden Proben um $\text{pH} \approx 5,5$ eine weiße Trübung auf. In dem Ansatz ohne κ -Carrageenan beobachtet man unterhalb von $\text{pH} \approx 2,5$ eine Aufklärung, während das in der carrageenanhaltigen Probe nicht der Fall ist.

Zur photographischen Darstellung der Ergebnisse vgl. auch Kapitel 3.5.2.2 des Theoretischen Teils.

Experiment 47: Vergleich der Gelstärken von κ -Carrageenan-Gelen auf Wasser- und Milchbasis

Chemikalien

Calciumchlorid (**Xi**; R: 36, S: 22-24), Magnesiumnitrat-Hexahydrat (**O**; R: 8, S: 24/25), Natriumchlorid, Kaliumchlorid, frische Vollmilch oder H-Milch (Fettgehalt: jeweils 3,5 %), κ -Carrageenan („Genulacta P-100“, Firma CP Kelco), entionisiertes Wasser, Eis.

Anzusetzende Lösung

Für den Versuch wird eine wässrige Lösung von CaCl_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, NaCl und KCl mit den in Tabelle 90 angegebenen Massenanteilen benötigt. Die Ca^{2+} -, Mg^{2+} -, Na^+ - und K^+ -Konzentrationen in dieser Salzlösung entsprechen denen in der wässrigen Phase von Vollmilch (vgl. Swaisgood 1985, S. 801).

Tab. 90: Zusammensetzung der herzustellenden Salzlösung.

Komponenten	Gehalt in mg pro 100 g Lösung
CaCl_2	107,7
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	185,6
NaCl	138,6
KCl	251,7

Geräte

2 Bechergläser (100 mL, niedrige Form), 2 Kristallisierschalen ($d = 14 \text{ cm}$), Petrischale ($d = 10 \text{ cm}$), 2 Messzylinder (50 mL), 2 heizbare Magnetrüher, 2 Rührfische ($l = 3 \text{ cm}$), 2 Stabthermometer, Waage, Stativmaterial, Magnetstab zur Entfernung von Rührfischen, langer dünner Spatel.

Durchführung

In den mit Rührfischen ($l = 3 \text{ cm}$) ausgestatteten Bechergläsern (100 mL, niedrige Form) wiegt man jeweils 0,150 g κ -Carrageenan ein. Jedes Becherglas wird dann an einem Stativ befestigt und auf der Heizplatte eines Magnetrüherers platziert.

In eines der beiden Bechergläser bringt man nun 50 mL der Salzlösung ein, deren Kationen-Konzentration der von Milch entspricht. Das andere Becherglas wird mit dem gleichen Volumen Vollmilch gefüllt.

Unter Rühren suspendiert man das κ -Carrageenan zunächst jeweils in der kalten Flüssigkeit. Anschließend werden die beiden Ansätze bei einer Temperatureinstellung des Magnetrührers von etwa 200 °C und mittlerer Rührgeschwindigkeit zehn Minuten erwärmt. Die Temperatur in den Proben ist dabei jeweils mit Hilfe eines am Stativ fixierten Stabthermometers zu überprüfen und sollte 80 °C nicht überschreiten.

Danach schaltet man die Heizungen und die Rührfunktionen der Magnetrührer aus und entfernt die Rührfische mit Hilfe eines Magnetstabes. Die eingespannten Bechergläser mit den entstandenen κ -Carrageenan-Solen auf Wasser- und Milchbasis werden nun jeweils in auf der Platte der Rührer platzierte Kristallisierschalen mit Eis-Kochsalz-Mischungen eingebracht und verbleiben 15 Minuten in diesen Kältebädern.

Die gebildeten Gele werden mit Hilfe eines langen dünnen Spatels vorsichtig von der Becherglaswand gelöst und in die Hälften einer Petrischale (d = 10 cm) überführt.

Ergebnisse

Während das κ -Carrageenan-Milchgel Schnittfestigkeit aufweist, ist die Gelfestigkeit des mit wässriger Salzlösung hergestellten Pendants wesentlich geringer: Es zerfällt bereits bei mechanischer Belastung durch Schütteln der Petrischale (vgl. auch Kapitel 3.5.2.2 des Theoretischen Teils).

Experiment 48: κ-Carrageenan als Kakaostabilisator

Chemikalien

κ -Carrageenan („Genulacta P-100“, Firma CP Kelco), H-Milch (Fettgehalt: 1,5 oder 3,5 %), Kakao, Saccharose, Natriumchlorid, Eis.

Geräte

2 Bechergläser (250 mL, hohe Form), 2 Kristallisierschalen (d = 14 cm), Messzylinder (100 mL), 2 Demonstrationsreagenzgläser, Reagenzglasgestell, 2 Mörser (d = 5,5 cm) mit Pistill, 2 Magnetrührer (heizbar), 2 Rührfische (l = 3 cm), 2 Stabthermometer, 2 Löffelspatel, Waage, Stativmaterial.

Durchführung

Die mit Rührfischen ($l = 3 \text{ cm}$) versehenen Bechergläser (250 mL, hohe Form) werden jeweils an einem Stativ befestigt und auf der Heizplatte eines Magnetrührers platziert. Bei einer Temperatureinstellung von $200 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt man anschließend in jedem der Bechergläser 90 mL H-Milch unter Rühren auf $\vartheta = 70 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Temperaturentwicklung ist jeweils mit Hilfe eines am Stativ fixierten Stabthermometers zu verfolgen.

Währenddessen werden in den beiden Mörsern die in Tabelle 91 aufgeführten Komponenten eingewogen und mit Hilfe der Pistille gründlich vermischt.

Tab. 91: Zusammensetzung der Trockenmischungen für die Zubereitung von Kakaotränken mit und ohne κ -Carrageenan als Stabilisator.

Komponenten	Mörser 1:	Mörser 2:
	Mischung mit κ -Carrageenan	Mischung ohne κ -Carrageenan
κ -Carrageenan	0,045 g	–
Kakao	1 g	1 g
Saccharose	6 g	6 g

Unter Rühren fügt man die Mischungen aus den Mörsern jeweils portionsweise mit Löffel- spateln zu der in den Bechergläsern temperierten H-Milch hinzu. Die beiden Ansätze werden nach Abschalten der Heizungen der Magnetrührer noch weitere fünf Minuten gerührt. Die Kakaotränk-Proben kühlt man anschließend unter Rühren auf Raumtemperatur ab. Zu diesem Zweck werden die an Stativen fixierten Bechergläser in zwei Kristallisierschalen ($d = 14 \text{ cm}$) mit Eis-Kochsalz-Kältemischungen eingebracht. Nach Erreichen der gewünschten Temperatur überführt man die Proben in Demonstrationsreagenzgläser. Letztere werden zur Beobachtung in einem Reagenzglasgestell platziert.

Ergebnisse

Während in dem Ansatz ohne Stabilisator schon nach kurzer Zeit das Absinken von Kakaopartikeln zu beobachten ist, tritt dieser Effekt im Falle des κ -Carrageenan enthaltenen Kakaotränkes nicht ein (vgl. auch Kapitel 3.5.2.2 des Theoretischen Teils).

3 Demonstrationen und Modelle

3.1 Alginat

3.1.1 Einführung

Demonstration 1: Funktion von Alginaten in Braunalgen
--

Zubehör

Getrocknete Braunalgen, Kristallisierschale, Wasser.

Vorgehensweise

Ein Teil einer getrockneten Braunalge wird über Nacht in einer mit Wasser gefüllten Kristallisierschale aufbewahrt. Die Schale sollte so bemessen sein, dass die Alge vollständig bedeckt ist.

Am nächsten Morgen liegt die Braunalge im rehydratisierten, stark aufgequollenen Zustand vor und zeigt die gleichzeitig flexible und robuste Beschaffenheit, die für marine Makroalgen charakteristisch ist.

3.1.2 Charakteristische Eigenschaften

Modell 1: Vereinfachtes Eierkarton-Modell für die Bindung von Ca^{2+}-Ionen durch Polyguluronat-Sequenzen
--

Zubehör

Eierkarton (für 6 oder 10 Eier), Pappmaché- oder Styropor-Kugeln ($d = 2,5 \text{ cm}$).

Vorgehensweise

Die Bindung von Calcium-Ionen durch Polyguluronat-Anionen lässt sich durch ein einfach anzufertigendes Eierkarton-Modell veranschaulichen: Die vom oberen Teil abgetrennte untere Hälfte eines Eierkartons legt man mit der Unterseite nach oben auf die Tischplatte.

Die beiden parallelen Dreier- oder Fünferreihen von Pappblöcken repräsentieren GG-Sequenzen, in deren Hohlräume sich Calcium-Ionen (symbolisiert durch Pappmaché- oder Styropor-Kugeln) so einlagern, dass sie insgesamt von je vier α -L-Guluronat-Resten eingeschlossen werden. Abbildung 116 dient der Verdeutlichung:

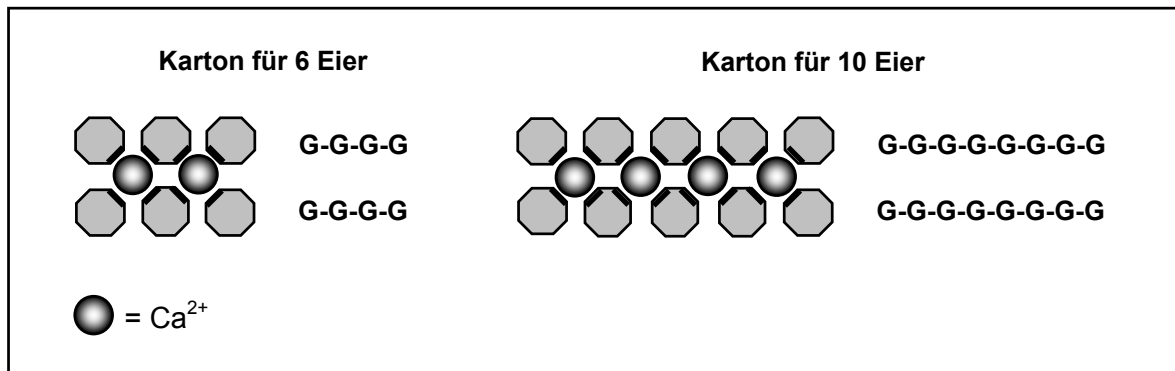


Abb. 116: Vereinfachtes Eierkarton-Modell zur Veranschaulichung der Bindung von Calcium-Ionen durch Polyguluronat-Sequenzen.

3.1.3 Ausgewählte Anwendungsmöglichkeiten

Modell 2: Veranschaulichung des In-Vivo-Austausches von radioaktivem Strontium

Zubehör

Eierkarton für 10 Eier, 2 Pappmaché- oder Styropor-Kugeln ($d = 2,5$ bzw. $3,5$ cm).

Vorgehensweise

Die vom oberen Teil abgetrennte untere Hälfte eines Eierkartons legt man mit der Unterseite nach oben auf die Tischplatte. Die beiden parallelen Fünferreihen von Pappblöcken repräsentieren GG-Sequenzen, in deren Hohlräume sich Ca^{2+} - und Sr^{2+} -Ionen (symbolisiert durch unterschiedlich große Pappmaché- oder Styropor-Kugeln) so einlagern, dass sie insgesamt von je vier α -L-Guluronat-Resten eingeschlossen werden (vgl. Abbildung 117).

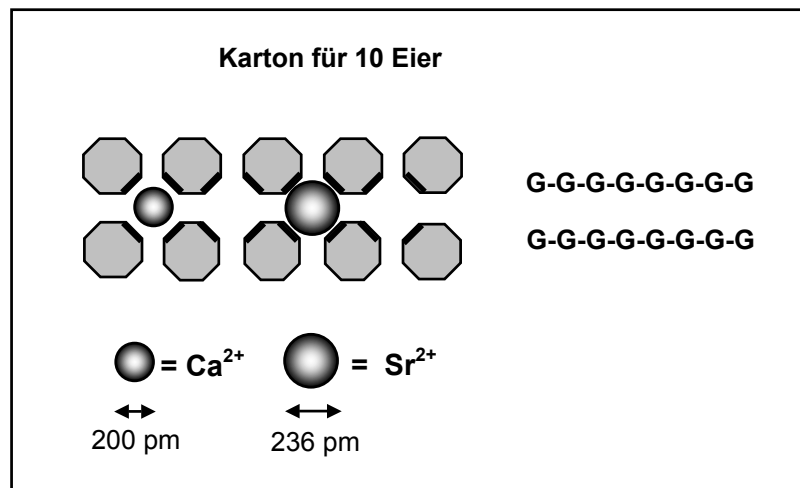


Abb. 117: Vereinfachtes Eierkarton-Modell (Grant et al. 1973, S. 195 ff.; Lutz/Müller 1991, S. 27; verändert) zur Verdeutlichung der Größenverhältnisse bei der Bindung von Ca^{2+} - und Sr^{2+} -Ionen durch Polyguluronat-Sequenzen (Angaben zu Durchmessern der nicht hydratisierten Kationen aus Mortimer 1996, S. 489).

Es wird deutlich, dass das Strontium-Ion aufgrund seines größeren Durchmessers „fester“ gebunden wird, d. h. besser mit den Sauerstoffen der Carboxylat- und Hydroxyl-Gruppen in den Hohlräumen guluronatreicher Alginat-Sequenzen interagieren kann, als das kleinere Calcium-Ion.

3.2 Carrageenane

3.2.1 Charakteristische Eigenschaften

Modell 3: ι -Carrageenan-Doppelhelix

Zubehör

Overheadfolie, 2 Büroklammern.

Vorgehensweise

Abbildung 118 zeigt eine auf den Innemantel eines Zylinders projizierte linksgängige Doppelhelix von ι -Carrageenan. Die beiden an der Helixbildung beteiligten Polysaccharid-Ketten werden durch Kennzeichnung mit durchgezogenen bzw. gestrichelten Linien voneinander unterschieden.

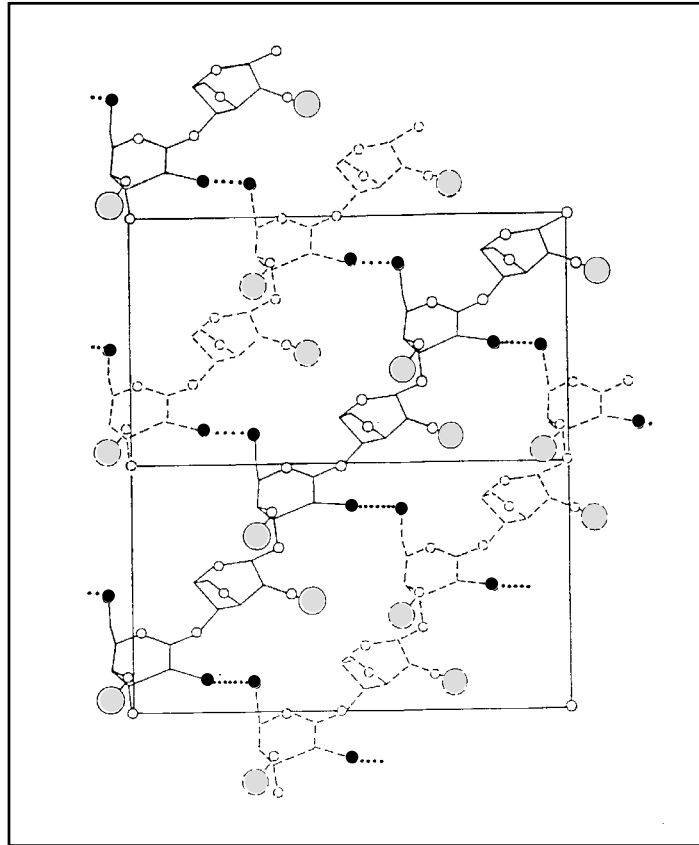


Abb. 118: Kettenanordnung in einer Doppelhelix von α -Carrageenan: Projektion auf den Innenmantel eines Zylinders (Anderson et al. 1969, S. 90; verändert).

Die Sauerstoff-Atome sind als weiße, die OH-Gruppen als schwarze und die SO_3^- -Reste der Sulfat-Gruppen als graue Kreise dargestellt. Intercatenare Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den C-2-Hydroxyl-Gruppen der einen Carrageenan-Sequenz und den in C-6-Position befindlichen OH-Gruppen der zweiten Kette stabilisieren die Doppelhelix. Diese werden durch schwarze Punkte angedeutet.

Die Struktur der α -Carrageenan-Doppelhelix kann mit Hilfe eines einfachen Modells veranschaulicht werden: Die auf einen Zylinderinnenmantel projizierte Helix aus Abbildung 118 wird vergrößert auf eine Overheadfolie kopiert. Rollt man diese Folie nun mit der bedruckten Seite nach innen zu einem Zylinder zusammen (Befestigung mit zwei Büroklammern), so erhält man eine „dreidimensionale“ Vorstellung davon, wie sich die beiden α -Carrageenan-Ketten räumlich anordnen müssen, um eine Doppelhelix zu bilden. Im Modell werden auch die intercatenaren Wasserstoffbrücken-Bindungen deutlich.

E LITERATURVERZEICHNIS

- Akin, C.: Biocatalysis with Immobilized Cells, in: Russel, G. E. (Hrsg.): *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Volume 5, Intercept, Wimborne, **1987**, S. 319 – 367.
- Allen, R. E. (Hrsg.): *The Concise Oxford Dictionary of Current English*, 8th Edition, Clarendon Press, Oxford, **1990**.
- Amann, W. et al.: *Elemente Chemie II: Unterrichtswerk für die Sekundarstufe II*, Klett, Stuttgart, **1989**.
- Anderson, N. S. et al.: X-ray Diffraction Studies of Polysaccharide Sulphates: Double Helix Models for κ - and ι -Carrageenans, *J. Mol. Biol.* **1969**, 45, S. 85 – 99.
- Antal, M. J./Mok, W./Richards, G. N.: Mechanism of Formation of 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde from D-Fructose and Sucrose, *Carbohydr. Res.* **1990**, 199 (1), S. 91 – 109.
- Armisen, R.: Agar, in: Imeson, A. (Hrsg.): *Thickening and Gelling Agents for Food*, 2nd Edition, Chapman & Hall, London, **1997**, S. 1 – 21.
- Askar, A.: Alginate: Herstellung, Eigenschaften und Verwendung in der Lebensmittelindustrie, *Alimenta* **1982**, 21, S. 165 – 169.
- Asselborn, W./Jäckel, M./Risch, K. T. (Hrsg.): *Chemie heute – Sekundarbereich II*, Schroedel, Hannover, **1998**.
- Atkins, P. W.: *Physikalische Chemie*, VCH, Weinheim, **1990**.
- Atkins, E. D. T./Mackie, W./Smolko, E. E.: Crystalline Structures of Alginic Acids, *Nature* **1970**, 225, S. 626 – 628.
- Bader, H. J. (Hrsg.): *Handbuch der experimentellen Chemie, Sekundarbereich II*, Band 12: Kunststoffe, Recycling, Alltagschemie, Aulis, Köln, **1997**.
- Bader, H. J./Steiner, D.: *Die Lehrpläne der Bundesländer Deutschlands für das Unterrichtsfach Chemie an Gymnasien: Eine Übersicht*, Palm & Enke, Erlangen, **1994**.
- Baird, J. K.: Gums, in: Kroschwitz, J. I./Howe-Grant, M. (Hrsg.): *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th Edition, Volume 12, Wiley-Interscience, New York, **1994**, S. 842 – 862.
- Belitz, H. D./Grosch, W.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 3. Auflage, Springer, Heidelberg, **1987**.
- Belitz, H.-D./Grosch, W./Schieberle, P.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 5. Auflage, Springer, Heidelberg, **2001**.
- Bergmeyer, H. U./Bernt, E.: Bestimmung mit Glucose-Oxidase und Peroxidase, in: Bergmeyer, H. U. (Hrsg.): *Methoden der enzymatischen Analyse*, Band II, 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, **1974**, S. 1250 – 1259.
- Bódalo, A. et al.: A Comparison of Different Methods of β -Galactosidase Immobilization. *Process Biochemistry* **1991**, 26, S. 349 – 353.

- Böeseken, J.: The Use of Boric Acid For the Determination of the Configuration of Carbohydrates, in: Pigman, W. W./Wolfrom, M. L. (Hrsg.): *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Volume 4, Academic Press, New York, 1949, S. 189 – 210.
- Bourgade, G.: U.S. Patent 112,535, **1871**.
- Briand, X.: Seaweed Harvesting in Europe, in: Guiry, M. D./Blunden, G. (Hrsg.): *Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential*, Wiley, Chichester, **1991**, S. 259 – 308.
- Breitmaier, E./Jung, G.: *Organische Chemie II: Spezielle Verbindungsklassen, Naturstoffe, Synthesen, Strukturaufklärung*, Thieme, Stuttgart, **1983**.
- Bucke, C.: Cell Immobilization in Calcium Alginate, in: Mosbach, K. (Hrsg.): *Methods in Enzymology*, Volume 135: Immobilized Enzymes and Cells, Part B, Academic Press, Orlando, **1987**, S. 175 – 189.
- BUK, Bundesverband der Unfallkassen e. V. (Hrsg.): *Regeln für Sicherheit und Gesundheitsschutz beim Umgang mit Gefahrstoffen im Unterricht (Regeln GUV 19.16)*, München, **2000 a**.
- BUK, Bundesverband der Unfallkassen e. V. (Hrsg.): *Anhang 1 zu den Regeln für Sicherheit und Gesundheitsschutz beim Umgang mit Gefahrstoffen im Unterricht (Regeln GUV 19.16 A)*, Aktualisierte Fassung, München, **2000 b**.
- Büyükgüngör, H.: Coimmobilization of Yeast and β -Galactosidase for Ethanol Formation from Cheese Whey, in: Neijssel, O. M./van der Meer R. R./Luyben, K. C. A. M. (Hrsg.): *Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology*, Volume 2, Elsevier Science, Amsterdam, **1987**, S. 60 – 63.
- Carr, J. M./Sufferling, K./Poppe, J.: Hydrocolloids and Their Use in the Confectionery Industry, *Food Technology* **1995**, 49 (7), S. 41 – 49.
- Carubelli, R.: Transformation of Disaccharides during Borate Ion-Exchange Chromatography: Isomerization of Lactose into Lactulose, *Carbohydr. Res.* **1966**, 2, S. 480 – 485.
- Cassan, K. de: *Zahnärztliches Lexikon der ZiiS-GmbH*. <http://www.zahngesund.de/suchen/zahnlexi.htm>, **2001**.
- Chen, J. P./Peng, J.: Uptake of Toxic Metal Ions by Novel Calcium Alginate Beads, *Advances in Environmental Research* **2000**, 3 (4), S. 439 – 449.
- Christen, H. R./Vögtle, F.: *Organische Chemie – Von den Grundlagen zur Forschung*, 1. Auflage, Band II, Salle und Sauerländer, Frankfurt am Main, **1990**.
- Clark, A. H./Ross-Murphy, S. B.: Structural and Mechanical Properties of Biopolymer Gels, in: Benoit, H. et al. (Hrsg.): *Advances in Polymer Sciences 83: Biopolymers*, Springer, Berlin, **1987**, S. 115 – 129.
- Claußen, P./Marburger, A.: *Alginate – Ausgewählte Versuche (unveröffentlicht)*, Philipps-Universität, Marburg, **2001**.
- ContinuingEducation.com: *Gastroesophageal Reflux Disease (GERD): More Than Just Heartburn*, <http://www.continuingeducation.com/pharmtech/gerd>, Talahassee, Florida, **2001**.
- Cottier, L./Descotes, G.: 5-(Hydroxymethyl)-furfural Syntheses and Chemical Transformations, *Trends Heterocycl. Chem.* **1991**, 2, S. 233 – 248.

- Cottrell, I. W./Kovacs, P.: Alginates, in: Davidson, R. L. (Hrsg.): *Handbook of Water-Soluble Gums and Resins*, McGraw-Hill, New York, **1980**, S. 2-1 – 2-43.
- Coulter, T. P.: *Food – The Chemistry of Its Components*, 2nd Edition, Royal Society of Chemistry Paperbacks, London, **1989**.
- Deetjen, P./Speckmann E.-J. (Hrsg.): *Physiologie*, 2. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München, **1994**.
- Dellweg, H.: *Biotechnologie: Grundlagen und Verfahren*, VCH, Weinheim, **1987**.
- Dellweg, H./Schmid, R. D./Trommer, W. E. (Hrsg.): *Römpp Lexikon Biotechnologie*, Thieme, Stuttgart, **1992**.
- Draget, K. I./Skjåk-Bræk, G./Smidsrød, O.: Alginate Gels: The Effect of Alginate Chemical Composition and Molecular Weight, *Carbohydr. Polym.* **1994**, 25, S. 31 – 38.
- Draget, K. I./Skjåk-Bræk, G./Smidsrød, O./Skjåk-Bræk, G.: Alginate from Algae, in: Vandamme, E./De Baets, S./Steinbüchel, A.: *Biopolymers*, Volume 6: Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukariotes, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, S. 215 – 244.
- Eisenbrand, G. /Schreier, P. (Hrsg.): *Römpp Lexikon Lebensmittelchemie*, Thieme, Stuttgart, **1995**.
- Eliel, E. L.: *Stereochemie der Kohlenstoffverbindungen*, Verlag Chemie, Weinheim, **1966**.
- Eliel, E. L./Wilen, S. H.: *Organische Stereochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- Falbe, J./Regitz, M. (Hrsg.): *Römpp Chemie Lexikon*, 9. Auflage, Band 1, Thieme, Stuttgart, **1995 a**.
- Falbe, J./Regitz, M. (Hrsg.): *Römpp Chemie Lexikon*, 9. Auflage, Band 2, Thieme, Stuttgart, **1995 b**.
- Falbe, J./Regitz, M. (Hrsg.): *Römpp Chemie Lexikon*, 9. Auflage, Band 3, Thieme, Stuttgart, **1995 c**.
- Falbe, J./Regitz, M. (Hrsg.): *Römpp Chemie Lexikon*, 9. Auflage, Band 4, Thieme, Stuttgart, **1995 d**.
- Falbe, J./Regitz, M. (Hrsg.): *Römpp Chemie Lexikon*, 9. Auflage, Band 5, Thieme, Stuttgart, **1995 e**.
- Falbe, J./Regitz, M. (Hrsg.): *Römpp Chemie Lexikon*, 9. Auflage, Band 6, Thieme, Stuttgart, **1995 f**.
- Firma Acordis Speciality Fibres: *Alginates Explained: Healing in an Ideal Environment*, Coventry, **o. J.**
- Firma Asiagel: *Fotos von der alten Firmen-Webseite (15.03.2001)*, abgedruckt mit Genehmigung von Asiagel, [http:// www.asiagel.com](http://www.asiagel.com). Manila, **2001**.
- Firma Braun a: *Sorbsan® ein Askina® Produkt: Wundauflagen aus Calciumalginat*, Mellungen, **o. J.**

- Firma Braun b: *Erfolgreiches Therapiekonzept des Decubitalulcus*, Melsungen, o. J.
- Firma Copenhagen Pectin (Hrsg.): *Carrageenan: General Description B 1*, 1996 a.
- Firma Copenhagen Pectin (Hrsg.): *Product Information 3307-08*, 1996 b.
- Firma Copenhagen Pectin (Hrsg.): *Product Information 5505-08*, 1996 c.
- Firma Copenhagen Pectin (Hrsg.): *Product Information 5522-10*, 1996 d.
- Firma CP Kelco a: *Genutine in Confectionery – Sales Points*, o. J.
- Firma CP Kelco b: *Application Bulletin: Gummy Candies with Genutine™ 300-C*, 2001.
- Firma Erbslöh a: *Produktmerkblatt Immoferm*, Geisenheim, 1998.
- Firma Erbslöh b: *Die Sektbereitung durch Flaschengärung und Anwendung von Immoferm*, Geisenheim, o. J.
- Firma Degussa Texturant Systems: *Product Overview: Carrageenans, What is P. E. S.?*, <http://www.texturant-systems.com>, 2003.
- Firma FMC BioPolymer: *Alginates as Dental Impression Materials*, <http://www.fmcbiopolymer.com>. Philadelphia, 2001.
- Firma Hartmann: *Die Calcium-Alginat-Kompresse mit der ausgezeichneten Tamponierbarkeit: Sorbalgon®*, Heidenheim, o. J.
- Firma ISP: *Alginates for Pharmaceutical Applications*, <http://www.isp-pharma.com/library/algpharm/algpharm.html>, Wayne, New Jersey 2001 a.
- Firma ISP: *Alginates in Raft Forming Antacids*, <http://www.isp-pharma.com/library/algraft/raft.html>, Wayne, New Jersey, 2001 b.
- Firma ISP: *Propylene Glycol Alginate – Manucol Ester® and Kelcoloid®*. <http://www.isp-corp.com/products/alginate/products/propylene.html>, Wayne, New Jersey, 2003.
- Firma ISP Alginates a: *Manugel DJX in Dental Impression Powder*, Tadworth, o. J.
- Firma ISP Alginates b: *Dental Impression Powder using Manugel® DJX Sodium Alginate*. Tadworth, o. J.
- Firma Kelco (Hrsg.): *Alginate Products for Scientific Water Control*, 3rd Edition, 1987.
- Firma Kelco (Hrsg.): *Structured Foods with the Algin/Calcium Reaction*, 1994.
- Firma Müller-Dental: *Datenblatt zur Materialsicherheit: tricolor-algin NF*, Lindlar, 2001 a.
- Firma Müller-Dental: *Praxisbedarf: Präzisions-Alginat-Abformmassen*. Lindlar 2001 b.
- Firma Nattermann: *Antazida – Von den Heilerden zum modernen Heilmittel in der Gastroenterologie*, http://www.maaloxan-welt.de/apo/apo_1.htm, Köln, 2001 a.
- Firma Nattermann: *Nicht nur Säureneutralisation: Breites Wirkungsspektrum der Antazida*, http://www.maaloxan-welt.de/apo/apo_2.htm, Köln, 2001 b.

- Firma Nattermann: *Kurzeinführung Säurebedingte Erkrankungen: Erkrankungen der Speiseröhre*, http://www.maaloxan-welt.de/intro/intro_03.htm, Köln, **2001 c**.
- Firma Nattermann: *Kurzeinführung Säurebedingte Erkrankungen: Grundlagen*, http://www.maaloxan-welt.de/intro/intro_02.htm, Köln, **2001 d**.
- Firma Nattermann: *Antazida – Bedeutende Basistherapeutika bei Magenerkrankungen*, http://www.maaloxan-welt.de/apo/apo_3.htm, Köln, **2001 e**.
- Firma Nattermann: *Sodbrennen und saures Aufstoßen – ein Fall für Antazida*, http://www.maaloxan-welt.de/pta/pta_2.htm, Köln, **2001 f**.
- Firma Nattermann: *Kurzeinführung Säurebedingte Erkrankungen: Behandlungsmöglichkeiten*, http://www.maaloxan-welt.de/intro/intro_05.htm, Köln, **2001 g**.
- Firma Nattermann: *Neue wissenschaftliche Erkenntnisse zu Antazida: Altes Heilmittel mit neuer Wirkung*, http://www.maaloxan-welt.de/pta/pta_5.htm, Köln, **2001 h**.
- Firma Novartis: *Sodbrennen? Gaviscon hilft auf der natürlichen Basis der Meeresalgen*, München, **2000 a**.
- Firma Novartis: *Gebrauchsinformation Gaviscon® Advance*, München, **2000 b**.
- Firma Novartis: *Gebrauchsinformation Gaviscon® Tabletten*, München, **2000 c**.
- Firma Pronova Biopolymer (Hrsg.): *Allgemeine Informationen – Alginate*, o. J.
- Firma Shemberg: *Carrageenan*, <http://www.shemberg.com/carrageenan.html>, Cebu, **2003 a**.
- Firma Shemberg: *Production/Process*, <http://www.shemberg.com/production.html>, Cebu, **2003 b**.
- Firma Systems Bio-Industries (Hrsg.): *Hydrokolloide*, **1987**.
- Fott, B.: *Algenkunde*, 2. Auflage, Fischer, Stuttgart, **1971**.
- Fox, J. E.: Seed Gums, in: Imeson, A. (Hrsg.): *Thickening and Gelling Agents for the Food Industry*, 2nd Edition, Chapman & Hall, London, **1997**, S. 262 – 283.
- Furia, T. E. (Hrsg.): *CRC Handbook of Food Additives*, 2nd Edition, CRC Press, Cleveland, **1972**.
- Gebler H./Kindl, G. (Hrsg.): *Pharmazie für die Praxis*, 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, **1996**.
- Gebler H./Kindl, G. (Hrsg.): *Pharmazie für die Praxis*, 4. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, **2000**.
- Gekas, V./López-Leiva, M.: Hydrolysis of Lactose: A Literature Review, *Process Biochemistry* **1985**, 20, S. 2 – 12.
- Gerstner, E.: *Versuche zur Chemie der Elemente der HCl- und H₂S-Gruppe auf der Basis von E. Fluck/C. Mahr, Anorganisches Grundpraktikum, Weinheim (1985)*. Marburg, **1986**.
- Gerstner, E.: *Skriptum zu Anorganisch-Chemischen Praktikum für Lehramtskandidaten (Teil I und II)*, 3. Auflage, Marburg, **1993**.

- Glaum, E./Wolff, R. (Hrsg.): *Chemie für die Sekundarstufe II*, 2. Auflage, Dümmler, Bonn, **1991**.
- Glicksman, M.: Seaweed Extracts: Introduction, in: Glicksman, M. (Hrsg.): *Food Hydrocolloids*, Volume II, CRC Press, Boca Raton, **1983 a**, S. 63 – 71.
- Glicksman, M.: Red Seaweed Extracts (Agar, Carrageenans, Furcelleran), in: Glicksman, M. (Hrsg.): *Food Hydrocolloids*, Volume II, CRC Press, Boca Raton, **1983 b**, S. 73 – 113.
- Glicksman, M.: Utilization of Seaweed Hydrocolloids in the Food Industry, *Hydrobiol.* **1987**, 151/152, S. 31 – 47.
- Gòdia, F./Casas, C./Solà, C.: Application of Immobilized Yeast Cells to Sparkling Wine Fermentation, *Biotechnol. Prog.* **1991**, 7, S. 468 – 470.
- Gomoll, M./Berger, R.: Immobilisierte Enzyme und Zellen, in: Ruttloff, H. (Hrsg.): *Industrielle Enzyme*, 2. Auflage, Behr, Hamburg, **1994**, S. 449 – 495.
- Gottwald, W.: *Statistik für Anwender: Die Praxis der instrumentellen Analytik*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- Grant, G. T. et al.: Biological Interactions between Polysaccharides and Divalent Cations: The Egg-Box Model, *FEBS Letters* **1973**, 32 (1), S. 195 – 198.
- Grasdalen, H./Larsen, B./Smidsrød, O.: ¹³C-NMR-Studies of Alginate, *Carbohydr. Res.* **1977**, 56, S. C 11 – C 15.
- Green, H. C.: U. S. Patent 2,036,934, **1934**.
- Greenberg, N. A./Mahoney, R. R.: Immobilisation of Lactase (β -Galactosidase) for Use in Dairy Processing: A Review, *Proc. Biochem.* **1981**, 16, S. 2 – 8; S. 49.
- Grindrod, J./Nickerson, T. A.: Effect of Various Gums on Skim Milk and Purified Milk Proteins, *J. Dairy Sci.* **1968**, 51, S. 834 – 841.
- Grøndal, J.: CP Kelco Products with New Chewing Qualities by Using Genutine™, Presentation at the ZDS International Symposium, September 11 – 13, Solingen, **2000**.
- Grunwald, P.: Enzyme Technology: A Practical Topic in Basic Chemical Education, *J. Chem. Ed.* **1986**, 63 (9), S. 775 – 776.
- Guiry, M. D./Nic Dhonncha, E.: *AlgaeBase*, <http://www.algaebase.org>, **2003**.
- Guiseley, K. B.: Chemical and Physical Properties of Algal Polysaccharides Used for Cell Immobilization, *Enzyme Microb. Technol.* **1989**, 11 (11), S. 706 – 716.
- Guiseley, K. B./Stanley, N. F./Whitehouse, P. A.: Carrageenan, in: Davidson, R. L. (Hrsg.): *Handbook of Water-Soluble Gums and Resins*, McGraw-Hill, New York, **1980**, S. 5-1 – 5-30.
- Hägerdal, B.: Enzymes Co-immobilized with Microorganisms for the Microbial Conversion of Non-metabolizable Substrates, *Acta. Chem. Scand.* **1980**, B 34 (8), S. 611 – 613.
- Hahn-Hägerdal, B.: Co-Immobilization Involving Cells, Organelles, and Enzymes, in: Mattiason, B. (Hrsg.): *Immobilized Cells and Organelles*, Volume 2, CRC Press, Boca Raton, **1983**, S. 79 – 94.

- Hahn-Hägerdal, B.: An Enzyme Coimmobilized with a Microorganism: The Conversion of Cellobiose to Ethanol Using β -Glucosidase and *Saccharomyces cerevisiae* in Calcium Alginate Gels, *Biotechnol. Bioeng.* **1984**, 26, S. 771 – 774.
- Hahn-Hägerdal, B.: Comparison between Immobilized *Kluyveromyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae* Coimmobilized with β -Galactosidase with Respect to Continuous Ethanol Production from Concentrated Whey Permeate, *Biotechnol. Bioeng.* **1985**, 27, S. 914 – 916.
- Haarlem, N. van (Hrsg.): Creating Texture, *Food Engineering & Ingredients* **2001**, 26 (7), <http://www.fei-online.de>.
- Hartmeier, W.: *Immobilisierte Biokatalysatoren: Eine Einführung*, Springer, Berlin, **1986**.
- Haug, A.: The Affinity of Some Divalent Metals to Different Types of Alginates. *Acta Chem. Scand.* **1961**, 15, S. 1794 – 1795.
- Haug, A.: *Ph. D. Thesis*, Norwegian Institute of Technology, Trondheim, **1964 a**.
- Haug, A.: *Composition and Properties of Alginates, Report No. 30*, Norwegian Institute of Seaweed Research, Trondheim, **1964 b**.
- Haug, A./Smidsrød, O.: The Effect of Divalent Metals on the Properties of Alginate Solutions, II. Comparison of Different Metal Ions, *Acta Chem. Scand.* **1965**, 19, S. 341 – 351.
- HKM, Hessisches Kultusministerium (Hrsg.): *Kursstrukturpläne Gymnasiale Oberstufe, Aufgabenfeld III, 4. Chemie*, Diesterweg, Frankfurt am Main, **1994**.
- HKM, Hessisches Kultusministerium (Hrsg.): *Rahmenplan Chemie, Sekundarstufe I*, 1. Auflage, Diesterweg, Frankfurt am Main, **1996**.
- HKM, Hessisches Kultusministerium (Hrsg.): *Lehrplan Chemie, Gymnasialer Bildungsgang, Jahrgangsstufen 8 bis 13*, <http://www.hessisches-kultusministerium.de/downloads/lehrpl/gymnasium/Chemie.pdf>, **2003**.
- Hobein, B./Lutz, B.: Versuche zur Mikroverkapselung, *PdN-Ch.* **1987**, 36 (2), S. 20 – 24.
- Hodgkinson, A. et al.: Radiostrontium Absorption in Man: Suppression by Calcium and by Sodium Alginate, *Canad. Med. Ass. J.* **1967**, 97, S. 1139 – 1143.
- Hoek, C. van den/Jahns, H. M./Mann, D. G.: *Algen*, 3. Auflage, Thieme, Stuttgart, **1993**.
- Holleman, A. S./Wiberg, E.: *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 91. – 100. Auflage, de Gruyter, Berlin, **1985**.
- Itzek, H./Schallies, M.: Alkoholische Gärung mit trägerfixierten Hefezellen in Halbmikrotechnik: Experimente zu modernen Verfahren der Biotechnologie, *Chem. Sch.* **1996**, 343 (12), S. 448 – 452.
- IUPMB, International Union of Biochemistry and Molecular Biology: *Enzyme Nomenclature, Recommendations (1992) of the Nomenclature Committee of the IUBMB*, Academic Press, Santiago, **1992**.

- Jäckel, M./Risch, K. T. (Hrsg.): *Chemie heute – Sekundarbereich II*, Schroedel, Hannover, **1988**.
- Jensen, A.: Production of Alginate, in: Wiessner, W./Schnepf, E./Starr, R. C. (Hrsg.): *Algae, Environment and Human Affairs*, Biopress, Bristol, **1995**, S. 79 – 92.
- Khym, J. X./Zill, L. P.: The Separation of Sugars by Ion Exchange, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, S. 2090 – 2094.
- King, A. H.: Brown Seaweed Extracts (Alginates), in: Glicksman, M. (Hrsg.): *Food Hydrocolloids*, Volume II, CRC Press, Boca Raton, **1983**, S. 115 – 188.
- Kirst, G. O./Kremer, B. P.: Algen: neue Nutz- und Kulturpflanzen, *Spektr. d. Wiss.* **1983**, 4, S. 22 – 33.
- Klein, J./Vorlop, K. D.: Immobilisierung von ganzen Zellen, in: Crueger, W. et al. (Hrsg.): *Jahrbuch Biotechnologie 1986/86*, Hanser, München, **1986**, S. 369 – 380.
- Klein, J./Vorlop, K. D./Steinert, H. J.: Deutsches Patent DE 34 32923, **1986**.
- Klein, J./Wagner, F.: Methods for the Immobilization of Microbial Cells, in: Chibata, I./Wingard, L. B. (Hrsg.): *Applied Biochemistry and Bioengineering*, Volume 4: Immobilized Microbial Cells, Academic Press, New York, **1983**, S. 11 – 51.
- Kosaric, N. et al.: Ethanol, in: Bohnet, M. et al. (Hrsg.): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6. Auflage der elektronischen Ausgabe, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- Kosaric, N./Duvnjak, Z.: Ethanol: Production by Yeast, in: Gerhardt, W. (Hrsg.): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th Edition, Volume A 9, VCH, Weinheim, **1987 a**, S. 596 – 605.
- Kosaric, N./Duvnjak, Z.: Ethanol: Fermentation Modes, in: Gerhardt, W. (Hrsg.): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th Edition, Volume A 9, VCH, Weinheim, **1987 b**, S. 609 – 615.
- Krefting, A.: British Patent 11,538, **1896**.
- Kringstad, K.: A System for Thin-Layer Chromatography of Carbohydrates, *Acta Chemica Scandinavica* **1964**, 18 (10), S. 2399.
- Kromer, W./Postius, S./Krüger, U.: Antiulcer Drugs, in: Bailey, J. E. et al. (Hrsg.): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6. Auflage der elektronischen Ausgabe. Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- Kuhnert, P./Bixler, H. J.: E 407 Carrageen, clever und raffiniert, *Gordian* **1993**, 10, S. 149 – 152.
- Kunkee, R. E./Eschnauer, H. R.: Wine, in: Bohnet, M. et al. (Hrsg.): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6. Auflage der elektronischen Ausgabe. Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- Lahbahn-Lucius, C.: Die enzymatische Bestimmung von Glukose mit Glukoseoxidase und Peroxidase – Herstellung von Teststreifen, *MNU* **1989**, 42 (8), S. 496 – 497.
- Labahn-Lucius, C.: Enzymtechnik im Schulversuch – Laktosespaltung in Milch und Molke durch immobilisierte Laktase, *MNU* **1990**, 43 (2), S. 108 – 113.

- Labahn-Lucius, C.: Milch – ein Nahrungsmittel für alle?, *UB* **1991**, 15 (170), S. 32 – 37.
- Le Gloahec, C. E./Herter, J. R.: U.S. Patent 2,128,551, **1938**.
- Lewis, J. G./Stanley, N. F./Guist, G. G.: Commercial Production and Applications of Algal Hydrocolloids, in: Lembi, C. A./Waaland, R. W. (Hrsg.): *Algae and Human Affairs*, Cambridge University Press, Cambridge, **1988**, S. 205 – 236.
- Lieske, B./Konrad, G.: Beitrag zur Lactosehydrolyse, *Die Nahrung* **1988**, 32 (6), S. 585 – 593.
- Lorenzen, P. C.: Etablierte und zukünftige Einsatzmöglichkeiten für Enzyme in der Milchtechnologie, in: Lösche, K. (Hrsg.): *Enzyme in der Lebensmitteltechnologie*, 1. Auflage, Hamburg, Behr, **2000**, S. 41 – 61.
- Lüning, K.: *Meeresbotanik: Verbreitung, Ökophysiologie und Nutzung der marinen Makroalgen*, Thieme, Stuttgart, **1985**.
- Lütke Twenhöven, F.: Die Nutzung von Algen, *UB* **1997**, 21 (225), S. 40 – 44.
- Lutz, B.: Fachwissenschaft, Lebenswirklichkeit und Chemieunterricht, in: Autorenteam unter Federführung von Pfeifer, P./Häusler, K./Lutz, B.: *Konkrete Fachdidaktik Chemie*, 2. Auflage, Oldenbourg, München, **1996**, S. 48 – 85.
- Lutz, B./Müller, V.: Alginate - Schleimiges aus Braunalgen, *PdN-Ch.* **1991**, 40 (2), S. 26 – 30.
- Lutz, B./Müller, V.: Katalyse in Natur und Technik: Die Natur, das große Vorbild, *NiU-Chemie* **1992**, 3 (11), S. 18 – 23.
- Mandel, K. G. et al.: Review Article: Alginate-Raft Formulations in the Treatment of Heartburn and Acid Reflux, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **2000**, 14 (6), S. 669 – 690.
- Maiorella, B. L./Castillo, F. J.: Ethanol, Biomass and Enzyme Production for Whey Waste Abatement, *Proc. Biochem.* **1984**, 8, S. 157 – 161.
- Marburger, A./Gerstner, E.: Alginate – Vielseitig verwendbare Polysaccharid-Derivate aus Braunalgen. *PdN-Ch.* **2000 a**, 49 (6), S. 22 – 30.
- Marburger, A./Gerstner, E.: Carrageenane – Polysaccharid-Derivate aus Rotalgen, die in aller Munde sind. *PdN-Ch.* **2000 b**, 49 (6), S. 31 – 39.
- Marburger, A./Rickelt, E./Schween, M.: *Alginate und Carrageenane – Algenpolysaccharide mit interessanten Eigenschaften und vielfältigen Anwendungen*, Lehrerfortbildungskurs, Teil 1 (gefördert durch die GDCh), Fachbereich Chemie der Philipps-Universität, Marburg, **2001 a**.
- Marburger, A./Rickelt, E./Schween, M.: *Alginate – Gewinnung aus Braunalgen und Verwendung in der Lebensmittelindustrie, Biotechnologie und Medizin*, Lehrerfortbildungskurs, Teil 2 (gefördert durch die GDCh), Fachbereich Chemie der Philipps-Universität, Marburg, **2001 b**.
- Marburger, A./Rickelt, E./Schween, M.: *Carrageenane – Gewinnung aus Rotalgen, Anwendung in der Lebensmittelindustrie und Nachweis in Nahrungsmitteln*, Lehrerfortbildungskurs, Teil 3 (gefördert durch die GDCh), Fachbereich Chemie der Philipps-Universität, Marburg, **2001 c**.

- Marburger, A.: Lebensmittelzusatzstoff „Carrageenan“, *Unterricht Chemie* **2002 a**, 13 (69), S. 30 – 31.
- Marburger, A.: Alginate in der Medizin – Anwendung in Wundauflagen, Dentalabdruckmassen und Medikamenten gegen Sodbrennen, *PdN-ChiS* **2002 b**, 51 (5), S. 27 – 35.
- Marburger, A.: *Alginate – Algenpolysaccharide mit interessanten Eigenschaften und vielfältigen Anwendungen im Alltag*, Lehrerfortbildungskurs 06/2003 des Lehrerfortbildungszentrums-Chemie Oldenburg/Bremen, Leer, **2003 a**.
- Marburger, A.: Immobilisierte Hefe-Zellen – Anwendung für die biotechnologische Ethanol-Gewinnung, *PdN-ChiS* **2003 b**, 52 (6), zur Publikation angenommen, Erscheinungsdatum: 1.9.2003.
- Marburger, A.: Schaumwein-Herstellung – Flaschengärung mit in Calciumalginat immobilisierten Hefe-Zellen, *PdN-ChiS* **2003 c**, 52 (6), zur Publikation angenommen, Erscheinungsdatum: 1.9.2003.
- Marburger, A.: Alginate in aller Munde: Lebensmittelzusatzstoffe aus Algen, in: *RAABits Chemie Sekundarstufe II*, Raabe, Stuttgart, **2003 d**, Autorenvertrag abgeschlossen, voraussichtliches Erscheinungsdatum: November 2003.
- Marinalg International, World Association of Seaweed Processors: *Products: Alginates*, http://www.marinalg.org/products/algina_inf.htm, Paris, **2003 a**.
- Marinalg International, World Association of Seaweed Processors: *Products: Carrageenan*, http://www.marinalg.org/products/carra_inf.htm, Paris, **2003 b**.
- Marinalg International, World Association of Seaweed Processors: *Products: Processed Eucheuma Seaweed (PES)*, http://www.marinalg.org/products/eucheu_inf.htm, Paris, **2003 b**.
- Marwaha, S. S./Kennedy, J. F.: Ethanol Production from Whey Permeate by Immobilized Yeast Cells, *Enzyme Microb. Technol.* **1984**, 6, S. 18 – 22.
- Mattiason, B.: Immobilization Methods, in: Mattiason, B. (Hrsg.): *Immobilized Cells and Organelles*, Volume I, CRC Press, Boca Raton, **1983**, S. 3 – 25.
- MEDIS Medizin-Informationsservice: *Sodbrennen: Reflux/Sodbrennen – eine Volkskrankheit*, http://www.medis-tv.de/themen/sod_0197.htm, Köln, **2001 a**.
- MEDIS Medizin-Informationsservice: *Wenn der Magen brennt – Sodbrennen*, http://www.medis-tv.de/themen/ref_0199.htm, Köln, **2001 b**.
- Mitchell, M. E./Guiry, M. D.: Carrageenan: A Local Habitat or a Name? *J. Ethnopharm.* **1983**, 9, S. 347 – 351.
- Moe, S. T. et al.: Alginates, in: Stephen, A. M. (Hrsg.): *Food Polysaccharides and Their Applications*, Dekker, New York, **1995**, S. 245 – 285.
- Mohamed, S. B.: *Protein Alginate Gels*, Ph. D. Thesis, University of Leeds, Leeds, **1981**.
- Morris, E. R.: Molecular Interactions in Polysaccharide Gelation, *Brit. Polym. J.* **1986**, 18 (1), S. 14 – 21.

- Morris, E. R./Rees, D. A./Robinson, G.: Cation-specific Aggregation of Carrageenan Helices: Domain Model of Polymer Structure, *J. Mol. Biol.* **1980**, 138, S. 349 – 362.
- Morris, E. R./Rees, D. A./Thom, D.: Chiroptical and Stoichiometric Evidence of a Specific, Primary Dimerisation Process in Alginate Gelation, *Carbohydr. Res.* **1978**, 66, S. 145 – 154.
- Mortimer, Ch. E.: *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*, 5. Auflage, Stuttgart, Thieme, **1987**.
- Mortimer, Ch. E.: *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*, 6. Auflage, Stuttgart, Thieme, **1996**.
- Nagashima, M. et al.: Large-Scale Preparation of Calcium Alginate-Immobilized Yeast Cells and Its Application to Industrial Ethanol Production, in: Mosbach, K. (Hrsg.): *Methods in Enzymology*, Volume 136, Academic Press, Orlando, **1987**, S. 394 – 405.
- National Centre for Biotechnology Education (Hrsg.): *Practical Biotechnology: Better Milk for Cats*, <http://www.ncbe.reading.ac.uk/NCB/PROTOCOLS/PRACBIOTECH/PDF/catmilk.pdf>, Reading, **2003**.
- Onsøyen, E.: Commercial Applications of Alginates. *Carbohydr. Eur.* **1996**, 14, S. 26 – 31.
- Onsøyen, E.: Alginates, in: Imeson, A. (Hrsg.): *Thickening and Gelling Agents for the Food Industry*, 2nd Edition, Chapman & Hall, London, **1997**, S. 22 – 44.
- Overath, A./Luider, E.: Saison im Garten des Meeres, *Geo* **1994**, 9, S. 78 – 92.
- Payens, T. A. J.: Light Scattering of Protein Reactivity of Polysaccharides, Especially of Carrageenans, *J. Dairy Sci.* **1972**, 55, S. 141 – 150.
- Pedersen, J. K.: Carrageenan, Agar und Xanthan als Geliermittel und Stabilisatoren, in: Neukom, H./Pilnik, W. (Hrsg.): *Gelier- und Verdickungsmittel in Lebensmitteln*, Forster, Zürich, **1980**, S. 113 – 133.
- Percival, E./McDowell, R. H.: Algal Polysaccharides, in: Dey, P. M. (Hrsg.): *Methods in Plant Biochemistry*, Volume 2: Carbohydrates, Academic Press, London, **1990**, S. 523 – 547.
- Pickett, D. L.: Antacids and Peptic Ulcer Treatment, in: Gerhartz, W. (Hrsg.): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5. Auflage, Band A 2, VCH, Weinheim, **1985**, S. 321 – 327.
- Pilnik, W./Voragen, A. G. J.: Pektine und Alginate, in: Neukom, H./Pilnik, W. (Hrsg.): *Gelier- und Verdickungsmittel in Lebensmitteln*, Forster, Zürich, **1980**, S. 67 – 93.
- Prenosil, J. E. et al.: Immobilized Biocatalysts, in: Elvers, B. et al. (Hrsg.): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th Edition, Volume A 14, VCH, Weinheim, **1989**, S. 1 – 48.
- Prey, V./Berkalk, H./Kausz, M.: Paper Chromatography of Organic Substances. VI. Thin-Layer Chromatography of Carbohydrates, *Microchimica Acta* **1961**, S. 968 – 978.
- Randall, D. et al.: *Tierphysiologie*, 3. Auflage, Thieme, Stuttgart/New York, **2000**.

- Raven, P. H./Evert, R. F./Curtis, H.: *Biologie der Pflanzen*, 2. Auflage, de Gruyter, Berlin, **1988**.
- Rees, D. A./Welsh, E. J.: Sekundär- und Tertiärstruktur von Polysacchariden in Lösungen und Gelen. *Angew. Chem.* **1977**, 89, S. 228 – 239.
- Rehberg, H. J.: Dental Impression Materials, in: Gerhartz, W. (Hrsg.): *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5. Auflage, Band A 8. VCH, Weinheim, **1987**, S. 284 – 289.
- Reimerdes, E. H.: Die biotechnologische Veredelung von Molke zur besseren Nutzung in der Ernährung, *GIT Fachz. Lab.* **1984**, 1, S. 27 – 32.
- Renn, D. W.: Seaweeds and Biotechnology – Inseparable Companions, in: Lindstrom, S. C./Gabrielson, P. W. (Hrsg.): *Thirteenth International Seaweed Symposium*, Kluwer Academic, Dordrecht, **1990**, S. 7 – 13.
- Risch, K./Seitz, H.: *Organische Chemie*, Aktualisierte Ausgabe, Schroedel, Hannover **1995**.
- Rizotti, R.: Carrageenan in Milk and Meat Products, in: Omran, H./Buckenhüskes, H. (Hrsg.): *Hydrocolloids in Food Processing, International Conference*, Suez Canal University, Ismailia, **1995**, S. 192 – 209.
- Roukas, T./Lazarides, H. N.: Ethanol Production from Deproteinized Whey by β -Galactosidase Coimmobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Ind. Microbiol.* **1991**, 7, S. 15 – 18.
- Ruttloff, H.: Lactase, in: Rutloff, H. (Hrsg.): *Industrielle Enzyme*, 2. Auflage, Behr, Hamburg, **1994**, S. 766 – 778.
- Rutloff, H./Proll, J./Leuchtenberger, A.: Lebensmittel-Biotechnologie und Ernährung – Probleme und Lösungsansätze, Springer, Berlin, **1997**.
- Scharf, K. H.: Trägerfixierte Zellen: Ein einfacher Schulversuch zur Immobilisierung von Hefezellen, *PdN-B.* **1987**, 36 (6), S. 37 – 38.
- Schmidt, A.: *Nachweis, Isolierung und Umwandlung von Milch-Inhaltsstoffen – Ausgewählte Versuche (unveröffentlicht)*, Philipps-Universität, Marburg, **1999**.
- SEAFDEC, Aquaculture Department Southeast Asian Fisheries Development Center: *The Farming of Kappaphycus*, <http://www.seafdec.org.ph>, Tigbauan, Iloilo, **2003**.
- Shukla, T. P.: Beta-Galactosidase Technology: A Solution to the Lactose Problem, *CRC Crit. Rev. Food Technol.* **1975**, 1, S. 325 – 356.
- Sime, W. J.: Alginates, in: Harris, P. (Hrsg.): *Food Gels*, Elsevier Applied Science, London, **1990**, S. 53 – 77.
- Skjåk-Bræk, G./Espevik, T.: Applications of Alginate Gels in Biotechnology and Biomedicine, *Carbohydr. Eur.* **1996**, 14 (5), S. 19 – 25.
- Skjåk-Bræk, G./Martinsen, A.: Applications of Some Algal Polysaccharides in Biotechnology, in: Guiry, M. D./Blunden, G. (Hrsg.): *Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential*, Wiley, Chichester, **1991**, S. 219 – 257.

- Skoryna, S. C./Paul, T. M./Waldron-Edward, D.: Studies on Inhibition of Intestinal Absorption of Radioactive Strontium, I. Prevention of Absorption from Ligated Intestinal Segments, *Canad. Med. Ass. J.* **1964**, 91, S. 285 – 288.
- Smidsrød, O./Draget, K. I.: Chemical and Physical Properties of Alginates, *Carbohydr. Eur.* **1996**, 14 (5), S. 6 – 13.
- Smidsrød, O./Glover, R. M./Whittington, S. G.: The Relative Extensions of Alginates Having Different Chemical Composition, *Carbohydr. Res.* **1973**, 27, S. 107 – 118.
- Smidsrød, O./Skjåk-Bræk, G.: Alginate as Immobilisation Matrix for Cells, *TIBTECH* **1990**, 8, S. 71 – 78.
- Snoeren, T. H. M.: Die Anwendung und Wirkung von Hydrokolloiden in Milchprodukten, in: Neukom, H./Pilnik, W. (Hrsg.): *Gelier- und Verdickungsmittel in Lebensmitteln*, Forster, Zürich, **1980**, S. 263 – 274.
- Snoeren, T. H. M.: *Kappa-Carrageenan: A Study on Its Physico-Chemical Properties, Sol-Gel Transition and Interaction with Milk Proteins*, Veenman & Zonen, Wageningen, **1976**.
- Snoeren, T. H. M. et al.: Electrostatic Interaction between κ -Carrageenan and κ -Casein, *Milchwissenschaft* **1975**, 30 (7), S. 392 – 396.
- Soedjack, H. S.: Colorimetric Determination of Carrageenans and Other Anionic Hydrocolloids with Methylene Blue, *Anal. Chem.* **1994**, 66, S. 4514 – 4518.
- Speijers, G. J. A./van Apeldoorn, M. E.: Propylene Glycol Alginate, *WHO Food Additive Series* 32, First Draft. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v32je12.htm>, **2003**.
- Sprössler, B./Plainer, H.: Immobilized Lactose for Processing Whey, *Food Technol.* **1983**, 10, S. 93 – 95.
- Stahl, E./Kaltenbach, U.: L. Zucker und Derivate, in: Stahl, E. (Hrsg.): *Dünnschicht-Chromatographie: Ein Laboratoriumshandbuch*, Springer, Berlin, **1962**, S. 473 – 481.
- Stanford, E. C. C.: British Patent 142, **1881**.
- Stanley, N. F.: Carrageenans, in: Harris, P. (Hrsg.): *Food Gels*, Elsevier Applied Science, London, **1990**, S. 79 – 119.
- Stara, J. F.: Repressive Action of Sodium Alginate on Absorption of Radioactive Strontium and Calcium in Cats, in: Kornberg, H. A. /Norwood, W. D. (Hrsg.): *Diagnosis and Treatment of Deposited Radionuclides*, Excerpta Medical Foundation, **1969**.
- Steiner, A. B.: *Manufacture of glycol alginates*. U. S. Patent 2,426,215, **1947**.
- Steiner A. B./McNeilly, W. H.: *High-Stability Glycol Alginates and Their Manufacture*, U. S. Patent 2,494,911, **1950**.
- Steiner, A. B./McNeely, W. H.: Organic Derivatives of Alginic Acid. *Industrial and Engineering Chemistry* **1951**, 43 (2), S. 2073 – 2077.
- Steinegger, E./Hänsel, R.: *Pharmakognosie*, 5. Auflage, Springer, Berlin, **1992**.

- Sutton, A.: Reduction of Strontium Absorption in Man by the Addition of Alginate to the Diet, *Nature* **1967**, 216, S. 1005 – 1007.
- Swaisgood, H. E.: Characteristics of Edible Fluids of Animal Origin: Milk, in: Fennema, O. R. (Hrsg.): *Food Chemistry*, Dekker, New York, **1985**, S. 791 – 827.
- Tanaka Y. et al.: Application of Polysaccharides as *in vivo* Binders of Metal Pollutants. *Proc. Int. Seaweed Symp.* **1972**, 7, S. 602 – 604.
- Tanaka, Y./Stara, J. F.: Algal Polysaccharides: Their Potential Use to Prevent Chronic Metal Poisoning, in: Hoppe, H. A./Levring, T./Tanaka, Y. (Hrsg.): *Marine Algae in Pharmaceutical Science*, de Gruyter, Berlin, **1979**, S. 525 – 543.
- Tausch, M./von Wachtendonk, M.: *Chemie S II: Stoff – Formel – Umwelt*, 2. Auflage, Buchner, Bamberg, **1993**.
- Teschner, M.: Calciumalginate in der Therapie infizierter und sekundär heilender Wunden, *Hartmann WundForum* **1996**, 1, S. 22 – 26.
- Tesk, J. et al.: Dental Materials, in: Kroschwitz, J. I. (Hrsg.): *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4. Auflage, Band 7. Wiley-Interscience, New York, **1993**, S. 946 – 1022.
- Thomas, W. R.: Carrageenan, in: Imeson, A. (Hrsg.): *Thickening and Gelling Agents for the Food Industry*, 2nd Edition, Chapman & Hall, London, **1997**, S. 45 – 59.
- Trius, A./Sebranek, J. G.: Carageenans and Their Use in Meat Products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1996**, 36 (1, 2), S. 69 – 85.
- UBC College of Botany: Algae: Useful Species, Common Names, Some of their Uses?, <http://www.botany.ubc.ca/algae/MACROCY2.JPG>, Vancouver **2003**.
- Vandermeulen, H.: Crude Extraction and Testing of Carrageenan, in: Lobban, C. S./Chapman, D. J./Kremer, B. P. (Hrsg.): *Experimental Phycology: A Laboratory Manual*, Cambridge University Press, Cambridge, **1988**, S. 164 – 167.
- Velde, I. F. van de/De Ruiter, G. A.: Carrageenan, in: Vandamme, E./De Baets, S./Steinbüchel, A.: *Biopolymers*, Volume 6: Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukariotes, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, S. 245 – 273.
- Vollhardt, K. P. C.: *Organische Chemie*, 1. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **1990**.
- Voragen, A. C. J./Pilnik, W.: Other Polysaccharides, in: Elvers, B./Hawkins, S./Russey, W. (Hrsg.): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5. Auflage, Band A 25, VCH, Weinheim, **1994**, S. 21 – 57.
- Vorlop, K. D./Steinert, H. J./Klein, J.: Cell Immobilization within Coated Alginate Beads or Hollow Fibers Formed by Ionotropic Gelation, *Ann. N. Y. Acad. of Sci.* **1987**, 8, S. 339 – 342.
- Wagner, G./Sommer, K.: Dünnschichtchromatographische Trennung und Identifizierung verschiedener Mono- und Disaccharide, *NiU-Chemie* **2001**, 12 (62), S. 29 – 32.
- Waldman, A. S. et al.: The Alginate Demonstration: Polymers, Food Science, and Ion Exchange, *J. Chem. Ed.* **1998**, 75 (11), S. 1430 – 1431.

- Wang, N. S.: *Experiment No. 7 b: Enzyme Immobilization Protocol: Entrapment in Alginate Gel*, <http://www.engr.umd.edu/~nsw/ench485/lab7b.htm>, **1998 a**.
- Wang, N. S.: *Experiment No. 11: Cell Immobilization with Calcium Alginate*, <http://www.engr.umd.edu/~nsw/ench485/lab11.htm>, **1998 b**.
- Weber, H. (Hrsg.): *Allgemeine Mykologie*, Fischer, Jena, **1993**.
- Wenck, H./Maerz, U.: Schulgeeignete Experimente zur Immobilisierung von Enzymen, *PdN-B.* **1987**, 36 (6), S. 16 – 21.
- Wenck, H./Maerz, U.: Ein neues biotechnologisches Verfahren zur Verwertung von Molke, *PdN-Ch.* **1988**, 37 (3), S. 36 – 38.
- Whyte, J. N. C.: Extraction of Alginic Acid from a Brown Seaweed, in: Lobban, C. S./Chapman, D. J./Kremer, B. P. (Hrsg.): *Experimental Phycology: A Laboratory Manual*, Cambridge University Press, Cambridge, **1988**, S. 168 – 173.
- Zemke-White, L.: *Environmental Impacts of Seaweed Farming in the Tropics*, Report Commissioned by Conservation International (Draft), http://www.biotours.co.nz/zemkewhite/lindsey/seaweed_impacts.pdf, **2003**.
- ZZuIV, Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken, ZZuIV-Zusatzstoff-Zulassungsverordnung vom 29 Januar 1998*, BGBl. I 1998 S. 230; 200 S. 1520; 2002, S. 4695, Gl.-Nr. L 2125-40-71, <http://www.umwelt-online.de/regelwerk/lebensmt/lebensmb.ges./zzulv1.htm>, **2003 a**.
- ZZuIV, Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken, ZZuIV-Zusatzstoff-Zulassungsverordnung vom 29. Januar 1998*, BGBl. I 1998 S. 230; 200 S. 1520; 2002, S. 4695, Gl.-Nr. L 2125-40-71, Anhang 4 Teil B, Zusatzstoffe, die nur für bestimmte Lebensmittel zugelassen sind, <http://www.umwelt-online.de/regelwerk/lebensmt/lebensmb.ges./zzulv3.htm>, **2003 b**.

F FIRMENVERZEICHNIS**Acordis Speciality Fibres**

101 Lockhurst Lane, Coventry CV6 5RS, Großbritannien

Tel.: 00 44/24/76 58 22 88

E-Mail: specialityfibres@acordis.com

Web-Seite: <http://www.specialityfibres.com>

Asiagel

504 Burke Bldg., Escolta, Manila, Philippinen

Tel.: 0 06 32/243-3951

E-Mail: asiagel@pacific.net.ph

Web-Seite: <http://www.asiagel.com>

B. Braun Petzold GmbH

Carl-Braun-Straße 1, 34212 Melsungen

Tel.: 0 56 61/71-0

E-Mail: info@bbraun.com

Web-Seite: <http://www.bbraun.de>

Caesar & Loretz GmbH

Herderstr. 35, 40721 Hilden

Tel.: 0 21 03/49 94-0

E-Mail: Info@Caelo.de

Web-Seite: <http://www.caelo.de>

Candulor Dental GmbH

Am Riedengraben 6, 78239 Rielassingen-Worblingen

Tel.: 0 77 31/5 20 75

E-Mail: candulor@candulor.de

Web-Seite: <http://www.candulor.de>

Cerestar Deutschland GmbH

Cerestarstr. 2, 47809 Krefeld

Tel.: 0 21 51/5 75-6 19

E-Mail: tmueller@de.cerestar.com

Web-Seite: <http://www.cerestar.com>

Copenhagen Pecton A/S (Nachfolgefirma: CP Kelco ApS)**CP Kelco ApS**

Ved Banen 16, DK-4623 Lille Skensved, Dänemark

Tel.: 00 45/56 16 56 16

E-Mail: Kontaktaufnahme per Formular auf der Homepage

Web-Seite: <http://www.cpkelco.com>

Degussa Texturant Systems GmbH

Lise-Meitner-Str. 34, 85354 Freising

Tel.: 0 81 61/548-0

E-Mail: texturants@degussa.com

Web-Seite: <http://www.texturantsystems.com>

Erbslöh Geisenheim Getränketechnologie GmbH & Co. KG

Erbslöhstr. 1, D-65366 Geisenheim
Tel.: 0 67 22/7 08-0
E-Mail: Service@erbsloeh-geisenheim.de
Web-Seite: <http://www.erbsloeh-geisenheim.de>

Eurogum A/S (Bezug von Produkten über die Firma Welding)

Symbion Science Park, Fruebjergvej 3, DK-2100 Kopenhagen, Dänemark
Tel.: 00 45/39 17 97 85
E-mail: eurogum@symbion.dk

FMC BioPolymer AS (ehemals: Firma Pronova Biopolymer AS)

P.O. Box 494, Havnegt 59, 3002 Drammen, Norwegen
Tel.: 00 47/32 20 36 00
E-Mail und Web-Seite: s. Firma FMC BioPolymer, Global Head Office

FMC BioPolymer, Global Head Office

1735 Market Street, Philadelphia, PA 19103, USA
E-Mail: Kontakt-Formular auf der Homepage
Web-Seite: <http://www.fmcbiopolymer.com>

F. Goebber KG

Bahnhofstr. 40, 27324 Eystруп
Tel.: 0 42 54/3 70
E-Mail: info@goebber.de
Web-Seite: <http://www.goebber.de>

P. Hartmann AG

Paul-Hartmann-Straße, 89522 Heidenheim
Tel.: 0 73 21/36-0
E-Mail: customer.service@hartmann-online.de
Web-Seite: <http://www.hartmann-online.de>

R. Hengstenberg GmbH & Co. KG

Mettinger Str. 109, 73728 Esslingen
Tel.: 07 11/3929-0
E-Mail: info@hengstenberg.de
Web-Seite: <http://www.hengstenberg.de>

Interorgana Chemiehandel GmbH & Co. KG

Wörthstr. 34, 50668 Köln
Tel.: 02 21/77 65-0
E-Mail: <http://www.into.de>
Web-Seite: interorgana@into.de

ISP (International Specialty Products), World Headquarters

131 Alps Road, Wayne, New Jersey 07470, USA
E-Mail: info@ispcorp.com
Web-Seite: <http://www.ispcorp.com>

ISP Alginates (U.K.) Limited (Übernahme des Alginat-Geschäfts der ehemaligen Firma Kelco)

Waterfield, Tadworth, Surrey KT20 5HQ, Großbritannien
Tel. 00 44/2 07/5 19-50 54, -50 55 oder -50 56

Kelco (Nachfolgefirma: ISP Alginates (U.K.) Limited)**C. Kühne KG GmbH & Co.**

Schützenstr. 38, 22761 Hamburg

Tel.: 0 40/85 30 52 60 (Konsumentenservice)

E-mail: christa.steffens@kuehne.de (Konsumentenservice)

Web-Seite: <http://www.kuehne.de>

Lidl Stiftung & Co. KG

Rötelstr. 30

74172 Neckarsulm

Tel.: 0 71 32/94-01

Merck KGaA

Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt

Tel.: 0 61 51/72-0

E-Mail: service@merck.de

Web-Seite: <http://www.merck.de>

Mertes GmbH & Co. KG

Bornwiese 4, 54470 Bernkastel-Kues

Tel.: 0 65 31/55-0

Web-Seite: <http://www.mertes.de> (derzeit im Aufbau)

Milchwerke Fränkische Rhön GmbH

Winkelser Str. 12, 97669 Bad Kissingen

Tel.: 09 71/80 42-0

E-Mail: Adressen der verschiedenen Abteilungen auf der Homepage

Web-Seite: <http://www.milchwerke-mainfranken.de>

Müller-Dental GmbH

Schlosserstr. 1, 51789 Lindlar

Tel.: 0 22 66/4 74 20

E-Mail: info@mueller-omicron.de

Web-Seite: <http://www.mueller-omicron.de>

Nattermann, Aventis Pharma Deutschland GmbH

Nattermannallee 1, 50829 Köln

Tel.: 02 21/5 09-01

Web-Seite: <http://www.nattermann-welt.de>

Novartis Consumer Health GmbH

Zielstattstraße 40, 81379 München

Tel.: 0 89/7 87 70 50

E-Mail: info.muenchen@ch.novartis.com

Web-Seite: <http://www.novartis.consumerhealth.de>

Dr. A. Oetker Nahrungsmittel KG

Lutterstr. 14, 33617 Bielefeld

Tel.: 05 21/1 55-0

E-mail: Kontaktaufnahme per Formular auf der Homepage

Web-Seite: <http://www.oetker.de>

Picodent Dental-Produktions- und -Vertriebs-GmbH

Lüdenscheider Straße 24 – 26, 51688 Wipperfürth

Tel.: 0 22 67/65 80-0

E-Mail: picodent@picodent.de

Web-Seite: <http://www.picodent.de>

Phywe Systeme GmbH

Robert-Bosch-Breite 10, 37079 Göttingen

Tel.: 05 51/604-0

E-Mail: info@phywe.de

Web-Seite: <http://www.phywe.de>

Pro Natura, Gesellschaft für gesunde Ernährung mbH

Justinianstr. 4, 60322 Frankfurt am Main

Tel.: 0 69/5 96 24 13

Pronova Biopolymer A/S (Nachfolgefirma: FMC BioPolymer AS)**Roche Diagnostics GmbH**

Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim

Tel.: 06 21/759-0

E-Mail:

Web-Seite: <http://www.roche.com>

RUF Lebensmittelwerk KG

Oldenburger Str. 1, 49610 Quakenbrück

Tel.: 0 54 31/1 85-0

E-Mail: info@ruf-lebensmittel.de

Web-Seite: <http://www.ruf-lebensmittel.de>

Schwälbchen Molkerei Jakob Berz AG

Bahnhofstr. 38

65307 Bad Schwalbach

Tel. 0 61 24/5 03-0

E-Mail: info@schwaelbchen-molkerei.de

Web-Seite: <http://www.schwaelbchen-molkerei.de>

Serva Electrophoresis GmbH

Carl-Benz-Str. 7

69115 Heidelberg

Tel.: 0 62 21/1 38 40-0

E-Mail: info@serva.de

Web-Seite: <http://www.serva.de>

Shemberg Corporation

SW Division, Jayme Street, Pakna-an, Mandaue City 6014, Cebu, Philippinen

Tel.: 00 63/32/3 46-07 89

E-Mail: info@shemberg.com.ph

Web-Seite: <http://www.shemberg.com>

Shemberg Europe A/S (Nachfolgefirma: Eurogum AS)**Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH**

Wunstferstraße 40, 30926 Seelze

Tel.: 0 51 37/82 38-0

E-Mail (Bestellungen): DEOrders@eurnotes.sial.com

Web-Seite: <http://www.sigma-aldrich.de>

Snamprogetti

Viale De Gasperi, 16, 20097 San Donato Milanese, Milano, Italien

Tel. 00 39/02/52 01

E-mail: info@snamprogetti.eni.it

Web-Seite: snamprogetti.it

Systems Bio-Industries

Kanzlerstr. 4, 40472 Düsseldorf

Tel.: 02 11/9 65 02-00

Welding GmbH & Co. (Bezug von Produkten der Firma Eurogum A/S)

Große Theaterstr. 50, 20354 Hamburg

Tel.: 0 40/3 59 08-0

E-Mail: mailbox@welding.de

Web-Seite: <http://www.welding.de>

G ANHANG

1 t-Tabelle

Tab. 92: t-Tabelle, zweiseitig für P = 95 % und P = 99 % (Gottwald 2000, S. 204; verändert)

f	P = 95 % zweiseitig	P = 99 % zweiseitig
1	12,706	63,657
2	4,303	9,925
3	3,182	5,841
4	2,776	4,604
5	2,571	4,032
6	2,447	3,707
7	2,365	3,499
8	2,306	3,355
9	2,262	3,250
10	2,228	3,169
11	2,201	3,106
12	2,179	3,055
13	2,160	3,016
14	2,145	2,977
15	2,131	2,947
16	2,120	2,921
17	2,110	2,898
18	2,101	2,878
19	2,093	2,861
20	2,086	2,845
21	2,080	2,831
22	2,074	2,819
23	2,069	2,807
24	2,064	2,797
25	2,060	2,787
26	2,056	2,779
27	2,052	2,771
28	2,048	2,763
29	2,045	2,756
30	2,042	2,750
∞	1,960	2,576

2 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Hartwig Perst und Herrn Dr. Ernst Gerstner danke ich ganz besonders für die engagierte Betreuung meiner Arbeit sowie die wohlwollende fachliche und persönliche Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft.

Des Weiteren möchte ich mich bedanken bei:

Frau Elisabeth Rickelt und Herrn Dr. Michael Schween für die gute Zusammenarbeit bei der Vorbereitung und Verwirklichung der Lehrerfortbildungskurse und Schülerworkshops;

Frau Petra Weiser (geb. Claußen) für die Durchführung ausgewählter Versuche zur Gewinnung und Verwendung von Alginaten und für die photographische Dokumentation ihrer experimentellen Ergebnisse;

Herrn Dr. Josef Knecht für die Auskünfte zur statistischen Auswertung von Analysendaten;

Frau Jenny Stilgebauer und Herrn Philipp Zilles für die konstruktive Kritik zu meiner Arbeit;

den Firmen CP Kelco, Eurogum, FMC BioPolymer, Interorgana, ISP Alginates und Welling für die kostenlose Bereitstellung zahlreicher Alginat- und Carrageenan-Muster sowie die exzellente Beratung in technischen Fragen, die wesentliche Voraussetzungen für die Realisierung meiner Arbeit darstellten.

Ein besonders herzlicher Dank gilt auch meinen Eltern und meinem Freund, die mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit immer verständnisvoll und geduldig zur Seite standen.