

# Enzyme im Alltag: Lactose Spaltung durch Lactase und Nachweis von Glucose mit Glucose-Dehydrogenase

Hofmann Lukas, Bützer Peter

## Lactoseintoleranz und Diabetes

Bis auf wenige Ausnahmen können Säuglinge den Milchzucker (Lactose) der Muttermilch gut verdauen. Der Milchzucker ist ein Zucker, der aus 2 Einfachzuckern, Glucose und Galactose, zusammengesetzt ist. Er muss enzymatisch aufgespalten werden, damit die Dünndarmschleimhaut ihn aufnehmen kann. Wird der mit der Nahrung aufgenommene Milchzucker, als Folge von fehlender oder verminderter Produktion des Verdauungsenzyms Laktase, nicht richtig verdaut, so spricht man von Lactoseintoleranz, Milchzuckerunverträglichkeit, Laktosemalabsorption, Laktasemangelsyndrom (Alaktasie)<sup>1, 2</sup>.

Wenn der Milchzucker nicht aufgenommen werden kann, wird er von Darmbakterien metabolisiert. Dadurch entstehen Darmgase (Blähungen vorwiegend mit CO<sub>2</sub> z.T. mit H<sub>2</sub>) und eine Reihe von niedermolekularen Abbauprodukten, die wie der Milchzucker selber osmotisch aktiv sind und Wasser binden, was zu Blähungen, Bauchkrämpfen bis zu Durchfall führen kann. Die H<sub>2</sub>-Bildung wird bei der Atemluft als Nachweis für Lactoseintoleranz verwendet.

Nach Absetzen der Muttermilch geht die Fähigkeit Lactose abzubauen verloren, wenn nicht weiter Milch zugeführt wird – das macht praktisch nur der Mensch!<sup>3</sup> Die Fähigkeit die Lactose der Milch im Darm abzubauen, hat sich daher in den letzten 10000 Jahren der Menschheit in den Bevölkerungsteilen, die zur Calciumversorgung auf Milch setzten, entwickelt.

Geografische Verteilung der Lactoseintoleranz<sup>4</sup>

<b>Ethnische Gruppe</b>	<b>Prävalenz</b>
Nord-Europäer	2-15%
Süd-Europäer	15-30%
Schwarze	60-80%
Asiaten	95-100%

Lactoseintoleranz kann genetisch bedingt sein (Gen auf Chromosom 2). Sie tritt manchmal auch vorübergehend nach Magen-Darm-Erkrankungen, Infektionen mit Parasiten in der Folge von anderen Erkrankungen wie Glutenintoleranz, aber auch bei Magersucht auf. Dieser sogenannte sekundäre Laktasemangel bildet sich zurück, wenn die auslösende Erkrankung abgeheilt ist.

Extern zugeführte Lactase vermindert das Risiko, an Flatulenz, Durchfall oder Bauchkrämpfen zu leiden um 61-68%, die Risikoverminderung, an Blähungen zu leiden, beträgt 40%.

---

<sup>1</sup> Schleip Thilo, Lactose-Intoleranz, Trias Verlag, Stuttgart, 2004

<sup>2</sup> Baltes Werner, Lebensmittelchemie, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, 1995, 265

<sup>3</sup> McGee Harold, On Food and Cooking, Charles Scribner's Sons, New York, 1984, 7

<sup>4</sup> Schlatter Chantal, Lactose-Intoleranz. Pharmaceutical Care Research Group, Universität Basel Nr. 20/28.10.04.

Diese Verwendung von Lactase steht in dieser Arbeit im Vordergrund, und zwar unter dem Gesichtspunkt der Geschwindigkeit, mit der das Enzym arbeitet.

Ist keine Lactase vorhanden, dann bildet sich auch keine Glucose. Das wäre für Diabetiker eigentlich gut, wenn da die Wirkungen der Lactoseintoleranz nicht wären.

Probleme können für Diabetiker mit Lactose immer zusätzlich zum hohen Brennwert<sup>5</sup> vermehrt auftreten, wenn die Glucosefreisetzung zu rasch wird. Somit stellt sich für die Beurteilung zentral die Frage nach der Geschwindigkeit der Lactosespaltung im Verdauungstrakt.

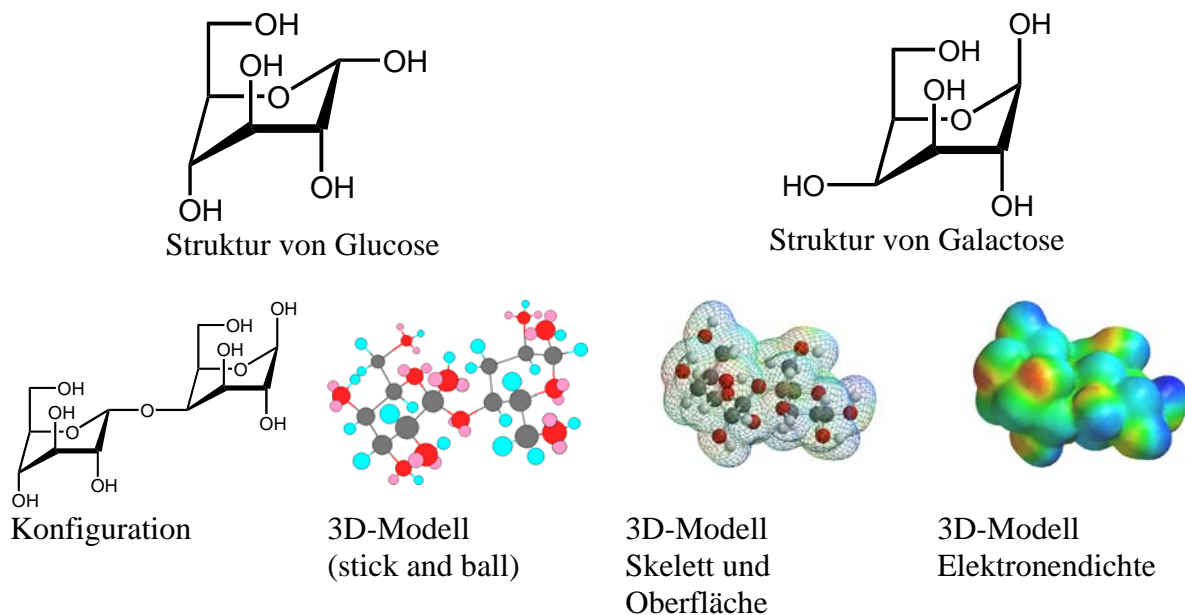
### Lactose

Lactose ist das wichtigste Kohlenhydrat der Milch aller Säugetiere. Von gewöhnlicher Hefe wird Lactose nicht vergoren, lediglich von Spezialhefen, wie beispielsweise Kefir.

Milchsäurebakterien wandeln Lactose zu Milchsäure um; auf diesem Prozess beruht das Sauerwerden der Milch.

Anaerobe Milchsäurebildung:  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (Lactose) +  $H_2O \rightarrow 4 C_3H_6O_3$  (Milchsäure)

Die Lactose (Milchzucker) ist ein Disaccharid (Zweifachzucker), sie besteht aus Glucose (Traubenzucker) und Galactose (Schleimzucker);  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ,  $M_r$  342,29. Sie ist mit etwa 4.5 – 5 g in 100 g Milch vertreten (in dieser Arbeit verwendeter Mittelwert: 4.7 g/100 g Milch = 137 mmol/l).



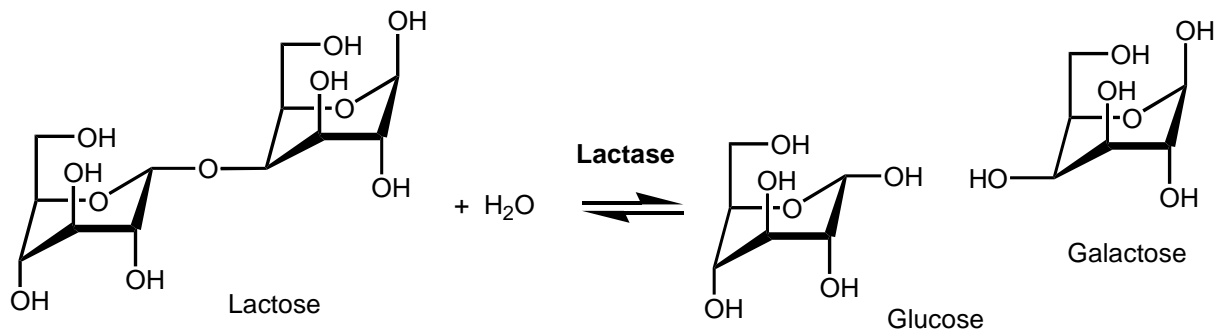
**Abbildung 1: Struktur der Lactose**

Betrachtet man die 3D-Modelle, dann stellt man fest, dass die Bindung zwischen der Glucose und der Galactose ziemlich „versteckt“ ist. Das weist auf besondere Eigenschaften des Enzyms Lactase hin, welches diese Bindung spalten kann.

<sup>5</sup> Lück Erich, Der Mensch is(s)t misstrauisch, Humboldt Verlags GmbH, 2003, 103

### Spaltung von Lactose

Im menschlichen Verdauungssystem wird die Lactose im Zwölffingerdarm durch das Enzym Lactase gespalten. Die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  für die Lactase ist ca. 18 (mmol/l)<sup>6</sup>.



Lactose Spaltung:  $\text{Lactose} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Lactase (Enzym)}} \text{Glucose} + \text{Galactose}$

### Abbildung 2: Spaltung von Lactose mit Lactase

Das Disaccharid Lactose wird dabei in seine Bausteine aufgetrennt, in Glucose und Galactose. Diese zwei Monosaccharide können anschliessend im Dünndarm und im Zwölffingerdarm problemlos aufgenommen werden.

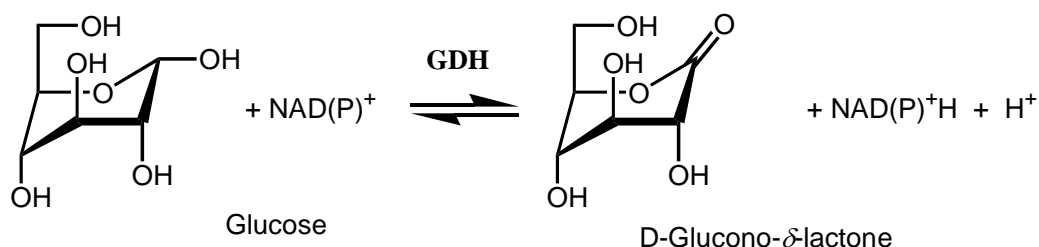
Fehlt das Enzym Lactase oder ist es in zu geringen Mengen im Darm vorhanden, dann kann die Lactose in den Nahrungsmitteln durch Zugabe von körperfremder Lactase gespalten werden.

### Aufgabenstellung:

Es stellt sich die Frage, wie rasch die Lactose beispielsweise in Milch durch die zugesetzte Lactase gespalten wird.

### Nachweis der Glucose mit Glucosedehydrogenase (GDH)

Für den Nachweis, der durch die Lactase freigesetzten Glucose wird ein enzymatisches Verfahren angewendet, das auch für die Bestimmung des Blutglucosegehaltes bei Diabetes eingesetzt wird.



### Abbildung 3: Reaktion von Glucose mit GDH und NADP

Oxidation eines Kohlenstoffs in Glucose:  $>\text{CH-OH} \rightarrow >\text{C=O} + 2\text{H}$

<sup>6</sup> Rehner Gertrud, Daniel Hannelore, Biochemie der Ernährung, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, 2002, 326

Bei dieser Reaktion werden Elektronen übertragen. Wenn man mit einer Elektrode die abgegebenen Elektronen aufnehmen, diese durch ein Strommessgerät leiten und über eine zweite Elektrode den Wasserstoffen abgeben kann, dann ist es möglich, über den Strom die Konzentration von Glucose zu bestimmen (Elektrochemie, Amperometrie). Für die Übertragung der Elektronen von der Glucose auf die Elektroden und die Wasserstoffe werden Übertragersubstanzen, so genannte Mediatoren eingesetzt (z.B. Phenanthroline und/oder Chinone)<sup>7</sup>.

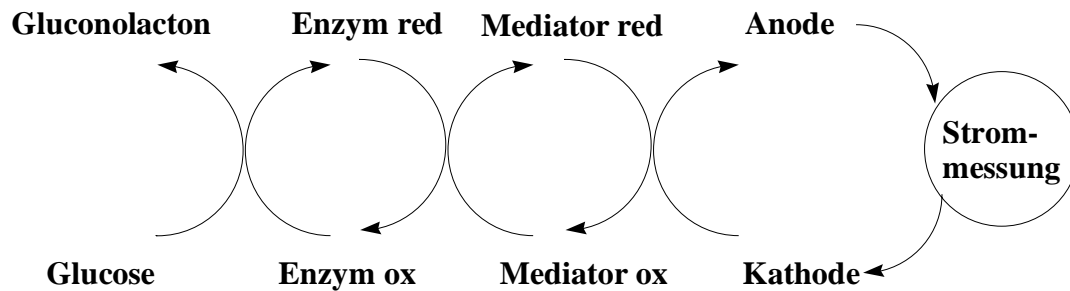


Abbildung 4: Amperometrische Glucose-Konzentrations-Bestimmung mit GDH

Dieses Messverfahren wird routinemässig zur Bestimmung der Glucosekonzentration in Mikroliter-Mengen von Blut oder Urin bei Diabetes angewandt.

### Diabetes, eine Störung des Stoffwechsels

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die dadurch entsteht, dass die Insulinproduktion in den  $\beta$ -Zellen der Langerhanschen Inseln in der Bauchspeicheldrüse gestört ist. Die Folge dieser gestörten Insulinproduktion sind erhöhte Blutzuckerwerte (Hyperglykämie). Als Diabetes renalis, auch Diabetes innocens oder Diabetes innocuus, bezeichnet man eine angeborene oder erworbene Störung der Nierenfunktion, die durch eine konstante Ausscheidung von Glukose im Urin, beim Nichtvorliegen eines Diabetes mellitus, gekennzeichnet ist.

### Nachweis von Diabetes

Diabetes kann entweder durch Blutzucker- oder Urinzucker- Bestimmungen diagnostiziert werden. Der Blutzuckerspiegel liegt nüchtern bei etwa 110 mg/dl nach dem Essen bei etwa bei 140 mg/dl. Mit einem Blutzucker- Messgerät kann die Blutzucker-Konzentration festgestellt und daraus die notwendige Insulinmenge abgeleitet werden.

Bei einer Glukosurie kann die Glucose mittels Teststreifen im Urin nachgewiesen werden. Ab einer Konzentration von 160-180 mg/dl Glucose im Blut wird diese im Urin ausgeschieden (Glukosurie).

### Experiment

Vollmilch (pasteurisiert) mit 3.8% Fett (Migros): Angaben auf der Verpackung: 100 ml enthalten: 282 kJ, 3.2g Eiweiss, 4.9g Kohlenhydrate, 3.9g Fett

<sup>7</sup> Bayer-Pörsch Kerstin, Messverfahren: Der chemische Vorgang, [http://images.diabetes-world.net/sixcms/media.php/41/testprinzip\\_\\_amperometrisch.pdf](http://images.diabetes-world.net/sixcms/media.php/41/testprinzip__amperometrisch.pdf), 2006-06-16

### Enzympräparat Lactigest®<sup>8</sup>

Eine Tablette mit 0.309 g enthält 60 mg Tilactase aus *Aspergillus oryzae* (Tilactase ein Enzym zur Spaltung von Lactose). Lactigest enthält 60 mg Tilactase, was mind. 3000 FCC (Food Chemical Codex<sup>9</sup>) oder 2250 E (Enzymeinheiten). Je höher der FCC-Wert eines Präparates, desto mehr Laktose kann im günstigsten Falle problemfrei mit der Nahrung aufgenommen werden.

Übliche Dosierung: Kinder ab 3 Jahren und Erwachsene: 1 Kautablette pro 5 g Lactose; entspricht 1 Kautablette pro 1 dl Milch.

**Tabelle 1: Systematik des Pilzes *Aspergillus oryzae*<sup>10</sup>, der zur Herstellung des Enzyms Lactase dient**

Abteilung:	Schlauchpilze (Ascomycota)
Klasse:	Echte Schlauchpilze (Ascomycetes)
Unterklasse:	Eurotiomycetidae
Ordnung:	Eurotiales
Familie:	Trichocomaceae
Gattung:	Giesskannenschimmel ( <i>Aspergillus</i> )
Art:	<i>A. oryzae</i>

Blutzucker- Messgerät: „Precision Xtra Plus“ von „MediSense<sup>11</sup>“

Dieses Messgerät verwendet Teststreifen, welche einen Blutropfen aufsaugen, die in das Gerät eingeführt werden müssen. Nach 20 s ist das Resultat ablesbar. Das Gerät ist in der Lage Blutzuckerkonzentrationen von 1.1 bis 27.8 mmol/l (entspricht 20-500 mg/ml) zu messen.

### Wie genau sind diese Messungen?

Genauigkeit ist definiert: Der Messwert eines Blutzucker-Messgerätes wird als "klinisch" genau bezeichnet, wenn er in einen Bereich von +/-15% (in den USA +/- 20%) einer anerkannten Referenz-Methode fällt. Als Vergleich dienen normalerweise hochpräzise Laborgeräte. Eine aussagekräftige Methode zur Abklärung, ob das Resultat genau ist, ist deshalb der Vergleich mit einem Laborgerät. Als Qualitätskontrollen werden daher regelmässig Vergleiche durchgeführt, um zu garantieren, dass man sich auf das Gerät und die Teststreifen verlassen kann.

Beispiel einer Qualitätskontrolle:

Gemessener Wert: 8 mmol/l

$8 \times 0.15 = 1.20$ ; zulässige Abweichung

$8 + 1.20 = 9.2$  mmol/l; hoher Bereich

$8 - 1.20 = 6.8$  mmol/l; tiefer Bereich

Der akzeptable Messbereich bei 8 mmol/l ist somit: 6.8 - 9.2 mmol/l

<sup>8</sup> Grogg Pharma AG, Lactigest, [http://www.groggpharma.ch/cms/front\\_content.php?idcat=11](http://www.groggpharma.ch/cms/front_content.php?idcat=11), 2006-06-16

<sup>9</sup> Food Chemical Codex (FCC) bzw. Aktivität der eingesetzten Enzyme. Entscheidend für die Wirkung eines Lactase-Präparates ist die Aktivität der eingesetzten Enzyme. 1 F.C.C. Lactase Einheit (F.C.C.LU) entspricht definitionsgemäss der Enzymmenge, die notwendig ist, um ein Micromol o-Nitrophenol pro Minute bei einem pH-Wert von 4,5 und 37°C freizusetzen. Lactase-Präparate können über verschiedene hohe FCC-Einheiten verfügen, angefangen bei 1.000 FCC/U.

<sup>10</sup> *Aspergillus oryzae*, [http://de.wikipedia.org/wiki/Aspergillus\\_oryzae](http://de.wikipedia.org/wiki/Aspergillus_oryzae), 2006-06-16

<sup>11</sup> Abbot Diabetes Care

## Durchführung

**Material:** Mörser mit Pistill, 10 ml Messzylinder, 1 ml Messpipette, 100 ml Becherglas, destilliertes Wasser, 60 ml Bechergläser.

Da 1 Liter Milch maximal 137 mmol Glucose enthalten, der Glucosekonzentrationstest jedoch nur von 1.1 bis 27.8 mmol/l messen kann, müssen die Milchproben 1/10 verdünnt werden!

Eine Tablette Lactigest® à 0.309g wird in einem Mörser mit dem Pistill zerrieben und in ein Becherglas mit 80 ml Milch gegeben. Um eine konstante Temperatur zu gewährleisten, wird das Becherglas in thermostatisiertes Wasserbad mit 37°C gestellt.

Die 60 ml Bechergläser werden mit 9 ml destilliertem Wasser gefüllt, um die zu messende Probe zu verdünnen.

Das Lactase Präparat wird der Milch zugegeben, gut gerührt und dann in Intervallen 1 ml Proben entnommen und im 60 ml Becherglas mit 9 ml destilliertem Wasser verdünnt.

Die Glucosekonzentration der verdünnten Flüssigkeit wird anschliessend mit den Teststreifen des Blutzucker- Messgeräts bestimmt.

## Ergebnisse

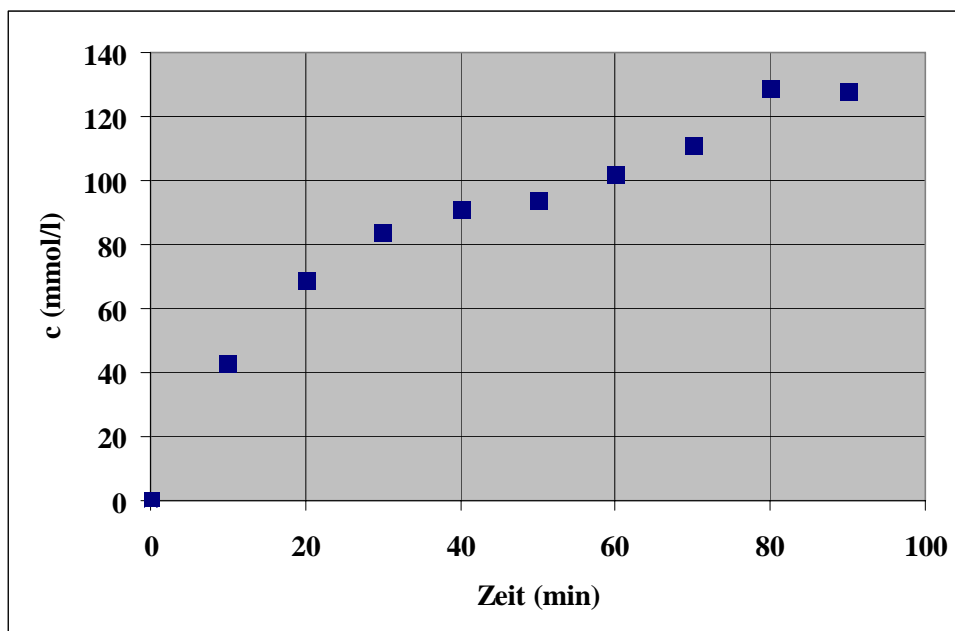


Abbildung 5: Glucosekonzentration im Verlauf der Zeit

Es fällt auf, dass während den ersten Minuten noch kein Wert dargestellt ist. Dies ist darauf zurück zu führen, dass das Messgerät erst ab 1.1 mmol/l einen Wert anzeigt.

Lactose kann auch durch Säureeinwirkung gespalten werden. Um diesen Einfluss zu erfassen wurde der pH- Wert der Milch während der Lactosespaltung gemessen. Es zeigte sich jedoch, dass der pH-Wert innerhalb der Messgenauigkeit konstant blieb.

## Aufgabenstellung

Man versuche mit einem geeigneten Modell den Verlauf der Glucosekonzentration mit einer Simulation nachzubilden.

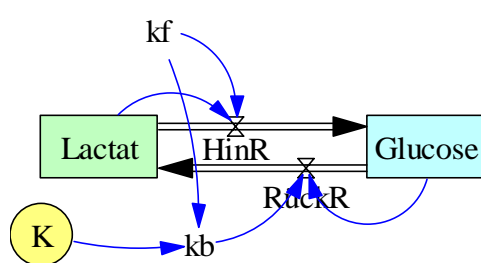
## Simulation

Bei der Simulation geht es darum ein Modell aufzubauen, das die Vorstellungen über die betrachteten Prozesse widerspiegelt. Der Vergleich mit den realen Messdaten kann dann einen Eindruck vermitteln, wie gut oder schlecht die Theorie mit der „Praxis“ übereinstimmt, so ganz im Sinne vom Erkenntnisphilosophen Karl Popper<sup>12</sup>: „Eine Aussage ist genau dann wahr, wenn sie mit den Tatsachen übereinstimmt.“

Annahmen:

- Die Lactatspaltung wird als Gleichgewichtsreaktion angenommen (trifft für alle enzymatischen Reaktionen zu)
- Die Wasserkonzentration ist konstant.
- Die gebildeten Glucose und Galactose haben keinen Einfluss auf die Lactatspaltung.

## Simulationsdiagramm



Lactat: Lactatmenge (hier pro Liter als Konzentration)

Glucose: Glucosemenge (hier pro Liter als Konzentration)

kf: Reaktionsgeschwindigkeits-Konstante vorwärts (forward)

kb: Reaktionsgeschwindigkeits-Konstante vorwärts (backward)

K: Gleichgewichtskonstante

## Gleichungen

- (01) FINAL TIME = 90  
Units: Minute  
The final time for the simulation.
- (02) Glucose= INTEG (HinR-RückR,0)  
Units: mmol
- (03) HinR= kf\*Lactat  
Units: mmol/Minute
- (04) INITIAL TIME = 0  
Units: Minute  
The initial time for the simulation.
- (05) K= 18  
Units: Dmnl [16,20]  
Nach: Rehner Gertrud, Daniel Hannelore, Biochemie der Ernährung, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, 2002, 326
- (06) kb= kf/K  
Units: 1/Minute [0,0.1]
- (07) kf= 0.03  
Units: 1/Minute [0,1]
- (08) Lactat= INTEG (+RückR-HinR,137)  
Units: mmol [0,147]

<sup>12</sup> Karl R. Popper (1902-1994) Physiker und Philosoph, Objektive Erkenntnis, campe, 1974

- 47 g Lactose pro Liter Milch = 137 mmol/l
- (09) RückR= kb\*Glucose  
Units: mmol/Minute
- (10) SAVEPER = 10  
Units: Minute [0,?]  
The frequency with which output is stored.
- (11) TIME STEP = 0.1  
Units: Minute [0,?]  
The time step for the simulation.

Ein wichtiger Hinweis zu Simulationen:  
Simulationen, bei denen die Einheiten nicht stimmen, sind wertlos!

### Zeitdiagramm

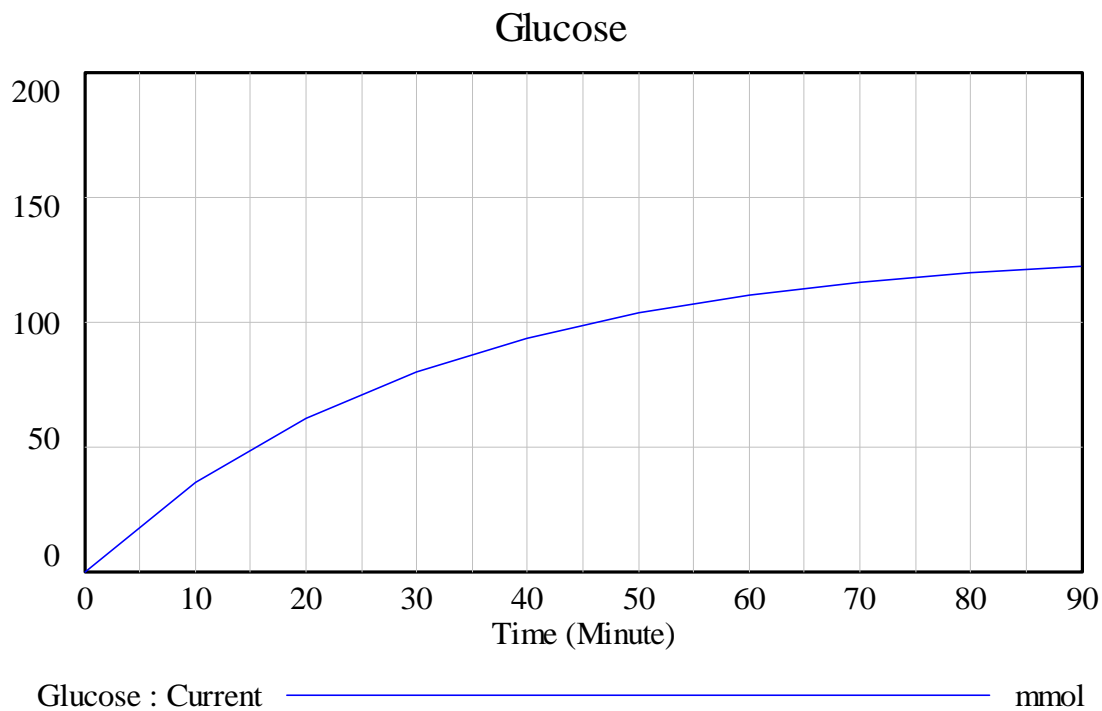


Abbildung 6: Simulation des zeitlichen Verlaufs der Glucose-Konzentration

## Vergleich

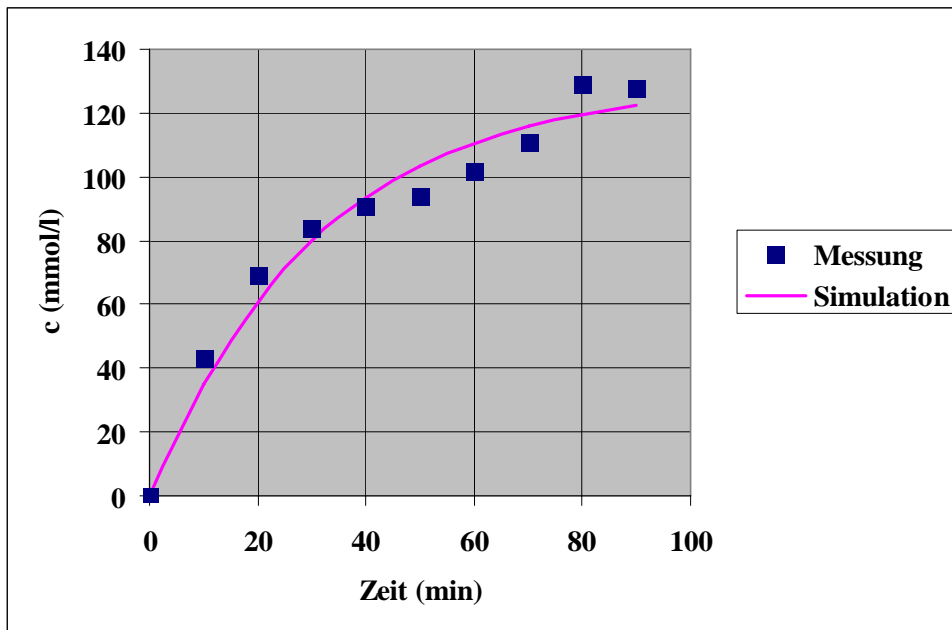


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der Glucose-Konzentration. Vergleich von Messresultaten und Simulation

Interpretation:

- Die Lactose-Spaltung mit Lactase zu Glucose und Galactose lässt sich mit den für Diabetes entwickelten Teststreifen gut verfolgen.
- Die Simulation zeigt, dass das Modell einer katalysierten Gleichgewichtsreaktion die Realität gut beschreibt.
- Lactose hat als Kohlehydrat für Diabetiker den Vorteil, dass der Blutzuckerspiegel wegen der enzymatischen Spaltung im Darm nur langsam ansteigt. Die Messungen geben einen Anhaltspunkt auf die Geschwindigkeit der Spaltung.

## Schlusswort

Aus der anfänglichen Idee die Verdauung von Milchzucker mit einem Enzym zu demonstrieren, entstand mit der Nachweismethode mittels Blutzucker- Messgerät eine interessante Kombination. Die Kombination von Lactoseintoleranz und Diabetes, lässt sich sehr gut in den Unterricht auf der Sekundarstufe I einbauen.

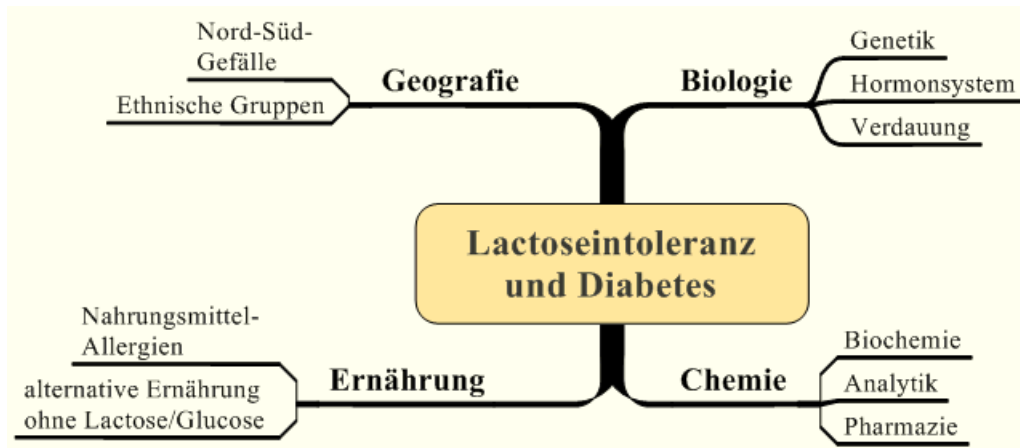


Abbildung 8: Einbettung von Lactoseintoleranz und Diabetes in den interdisziplinären Unterricht