

Methoden zur Untersuchung von Papier, Karton und Pappe für Lebensmittelverpackungen und sonstige Bedarfsgegenstände

5. Bestimmung von Einzelsubstanzen

5.19 Levanase

1. Allgemeine Angaben

Bezeichnung in der Empfehlung XXXVI: Levanase (E.C. 3.2.1.65) (Synonym: 2,6-β-D-Fructan Fructanohydrolase)

Bezeichnung in der Empfehlung XXXVI/2: Levanase (E.C. 3.2.1.65)

Ordnungsnummer in der Empfehlung XXXVI: B VII, Schleimverhinderungsmittel

Stand: April 1991

Analytisches Messprinzip: Photometrie

Bearbeiter: H.-W. Wollenweber*

* Henkel KGaA, Postfach 1100, 4000 Düsseldorf

2. Grundlage des Verfahrens

Die zu untersuchende Probe wird zerkleinert, mit Citratpuffer extrahiert und im Extrakt die Levanase-Aktivität bestimmt. Durch das Enzym Levanase werden aus Levan Fructoseoligomere freigesetzt. Deren reduzierendes Ende reagiert mit alkalischem Tetrazolium-Blau zu einem Formazan-Farbstoff. Andere reduzierende Zucker können ebenfalls erfasst werden. Unter den alkalischen Bedingungen der Farbentwicklung werden aus Oligomeren noch hydrolytisch reduzierende Zucker freigesetzt, daher wird die Farbentwicklung durch Zugabe von Phosphorsäure gestoppt. Es wird photometrisch bei 595 nm die Extinktion bestimmt und mit einer erstellten Standardkurve mit Fructose verglichen. Daraus ergibt sich die Aktivität der Levanase, bezogen auf den Standard.

3. Chemikalien und Lösungen

Es sind ausschließlich Reagenzien des Reinheitsgrades „zur Analyse“ und frisch bidestilliertes Wasser zu verwenden.

Chemikalie	Konzentration	Sonstige Angaben
Tetrazolium-Blau-Chlorid (3,3' - [3,3'-Dimethoxy(1, 1' -biphenyl)-4,4'-diyl]-bis[2,5-diphenyl- 2H - tetrazolium]dichlorid)	k. A.	(C ₄₀ H ₃₂ N ₈ O ₂ Cl ₂), M = 766 g/mol (Tetrazol-Blau)
Levan	k. A.	(z.B. Fa. Sigma; Lot-Nr. beachten!)
Natriumhydroxid	k. A.	(NaOH), M = 40,00 g/mol

o-Phosphorsäure	k. A.	(H ₃ PO ₄), Q = 1,75 g/ml
D(-)Fructose	k. A.	(C ₆ H ₁₂ O ₆), M = 180,16 g/mol
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	k. A.	(C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2H ₂ O), M = 294,1 g/mol
Citronensäure-Monohydrat	k. A.	(C ₆ H ₈ O ₇ · 2H ₂ O), M = 210,14 g/mol
Methanol	k. A.	(CH ₃ OH)

Tabelle 1 Chemikalien

Lösungen

- 3.1 Natriumhydroxid-Lösung, c = 2 % m/V
- 3.2 Tetrazolium-Blau-Reagenz, c = 0,2 % m/V: 0,5 g Tetrazolium-Blau-Chlorid und 10 ml Methanol (siehe Tabelle 1) mit Wasser auf 250 ml auffüllen und unter leichter Erwärmung (bis ca. 35°C) auflösen.
- 3.3 c = 50 mMol Natrium-Citrat-Puffer (pH 5,0): 14,7 g tri-Natriumcitrat (siehe Tabelle 1) werden in 1000 ml Wasser gelöst. 10,5 g Citronensäure (siehe Tabelle 1) werden in 1000 ml Wasser gelöst. Zu 1000 ml tri-Natriumcitrat-Lösung werden ca. 480 ml Citronensäure-Lösung gegeben, es wird gemischt (pH-Kontrolle).
- 3.4 o-Phosphorsäure- Lösung (c = 25 %). 143 ml o-Phosphorsäure werden in 357 ml Wasser gelöst.
- 3.5 Levan-Lösung, c = 4,5 %. 0,9 g Levan und 20 ml Wasser werden 2 h bei 2000 UPM, 0,5 cm Amplitude im Schraubdeckelglas geschüttelt (kein Magnetrührer). Im Kühlschrank bis max. 1 Woche lagerfähig.
- 3.6 Farbreagenz: 30 ml Natriumhydroxid-Lösung (siehe Tabelle 1) werden mit 10 ml Tetrazolium-Blau-Reagenz (siehe Tabelle 1) gemischt. Das Reagenz muss täglich frisch angesetzt werden.
- 3.7 Fructose-Eichlösung (0,5 mg/ml). 50 mg Fructose werden in 100 ml H₂O gelöst. 0,5 mg/ml = 2,78 µMol/ml.

Verdünnungsreihe für Eichkurve

Lösung	Mischen von		mg/ml	µMOL/ml
	µLösung 3.7	und µl Wasser		
3.7.1	1000	0	0,50	2,78
3.7.2	800	200	0,40	2,21
3.7.3	600	400	0,30	1,66
3.7.4	400	600	0,20	1,11
3.7.5	200	800	0,10	0,56
3.7.6	100	900	0,05	0,28
3.7.7	0	1000	0,00	0,00

Tabelle 2 Lösungen

4. Geräte

- 4.1 Spektralphotometer (595 nm), DIN 58960T1
- 4.2 Glas- oder Kunststoffküvette, Schichtdicke 1,0 ern
- 4.3 Analysenwaage, Messgenauigkeit 0,001 g

- 4.4 Messkolben mit Kegelschliffhülse und Stopfen, 1000 ml, 500 ml, 100 ml, 10 ml, DIN 12664 (= ISO 1042-1983)
- 4.5 Bechergläser 1000 ml, 500 ml, 100 ml, 50 ml, DIN 12331
- 4.6 Schraubdeckelglas 25 ml
- 4.7 Reagenzgläser oder Polypropylen-Reaktionsgefäße 2,2 ml
- 4.8 Messzylinder mit Strichteilung, 50 ml, DIN 12680 T1
- 4.9 pH -Messgerät mit Glaselektrode, DIN 19263
- 4.10 Wasserbäder 50°C und 100 °C mit Reaktionsgefäßhalter
- 4.11 Stoppuhr (Sekundengenauigkeit)
- 4.12 Laborzentrifuge (2000 g)
- 4.13 Schüttelmaschine (2000 UPM; 0,5 cm Amplitude)
- 4.14 Laborrührer
- 4.15 Aufschlaggerät (z.B. Ultra-Turrax)
- 4.16 Kolbenhubpipetten, DIN 12650 T2

5. Probenahme und Probenvorbereitung

5.1 Probenahme

Die Probenahme ist im Prüfbericht (12) genau zu beschreiben. Damit keine Veränderung der Probe bis zur Durchführung der Prüfung eintritt, ist die Probe in Aluminiumfolie einzuschlagen.

5.2 Probenvorbereitung

Die Probe wird in Schnitzel von ca. 1x1 cm Kantenlänge zerschnitten. Außerdem sind für die Bestimmung der flächenbezogenen Masse nach DIN ISO 536 und zur Bestimmung des Feuchtigkeitsgehaltes nach DIN ISO 287 gesondert mengengerechte Anteile zu entnehmen.

6. Bestimmung der flächenbezogenen Masse nach DIN ISO 536

7. Bestimmung des Feuchtigkeitsgehaltes nach DIN ISO 287

8. Extraktion der Probe

Von der zerschnittenen Probe werden 10 g auf 0,001 g genau gewogen, in ein 250 ml Becherglas gegeben, mit ca. 50 ml Citratpuffer (siehe Tabelle 1) übergossen und mit einem Aufschlaggerät zerkleinert. Das Aufschlaggerät wird anschließend sorgfältig mit ca. 10 ml Phosphatpuffer abgespült. Die vorbereitete Probe wird mit einem Magnetrührer 15 min bei 40 °C gerührt (Wasserbad). Nach dem Abkühlen wird die Probe quantitativ in einen 100 ml-Messkolben übergeführt und mit Phosphatpuffer bis zur Marke aufgefüllt. Vor der Durchführung der Bestimmung wird die Probe zentrifugiert und der Überstand (Enzymprobe) für die Untersuchung eingesetzt.

9. Versuchsdurchführung

9.1 Standardkurve

- Es werden je 4 Proben in Reaktionsgefäßen (2,2 ml) parallel angesetzt; dazu kommen 120 µl Citrat-Puffer (3.3) und 80 µl Standard-Verdünnungen (Lösungen 3.7.2 bis 3.7.8)

- Vorwärmen: ca. 5 min bei 50°C im Wasserbad
 - 800 µl Farbreagenz (3.6) zugeben
 - Proben verschließen und auf Laborrührer mixen
 - Inkubation: genau 15 min bei 50°C im Wasserbad
 - Proben aus dem Wasserbad nehmen
 - 1000 µl Phosphorsäure-Lösung (3.4) zufügen
 - Messen der Extinktion der Proben bei 595 nm gegen Luft
- (Proben dürfen vor der Messung nicht länger als 30 min stehen bleiben).

9.2 Enzymreaktion

9.2.1 Hitzeinaktivierung der Enzymlösung

Für die Bestimmung des Blindwertes werden 2 ml der zu untersuchenden Enzymprobe 10 min bei 100°C im Wasserbad inaktiviert und abzentrifugiert. Der Überstand wird nach dem Abkühlen als Blindprobe eingesetzt (siehe 9.2.2).

9.2.2 Pipettierschema für Enzymansatz

Es werden Verdünnungen von Blindprobe und Enzymprobe mit Citratpuffer (3.3) angesetzt, so dass die Extinktionsdifferenz im angegebenen Bereich liegt (siehe 10.4). Notieren des jeweiligen Verdünnungsfaktors (VF). Blindwerte werden als 3fach-Bestimmung und Enzymproben als 5fach-Bestimmung angesetzt.

Es werden 8 Proben in Reaktionsgefäßen (2,2 ml) parallel angesetzt

- 80 µl Citratpuffer (3.3) und
- 40 µl Enzymlösung (je 3 mal Blindprobe und 5 mal Enzymprobe) zugeben
- Vorwärmen: ca. 5 min bei 50°C im Wasserbad
- 80 µl Levan (3.5), auf 50°C vorgewärmt zusetzen
- Gefäße verschließen und kurz schütteln
- Inkubation: genau 10 min bei 50°C im Wasserbad
- 800 µl Farbreagenz (3.6) zugeben
- Proben verschließen und auf Laborrührer mixen
- Inkubation: genau 15 min bei 50°C im Wasserbad
- Proben aus Wasserbad nehmen
- 1000 µl Phosphorsäure-Lösung (3.4) zusetzen

Messen der Extinktion der Proben bei 595 nm gegen Luft in Küvetten

(Proben dürfen vor der Messung nicht länger als 30 min stehen bleiben).

10. Auswertung

10.1 Standardkurve

Auftragung der Fructose-Konzentration (X-Achse) gegen den Mittelwert der zugehörigen Extinktionswerte (Y-Achse, Differenz von E_1 -Standardwert minus E_2 -Nullwert.)

Berechnung der Steigung (ST) der Eichgeraden (Differenz zweier E-Werte dividiert durch die Differenz der zugehörigen Fructose-Konzentration der Ausgleichsgeraden). Bei der Erstellung der Standardkurve von den Lösungen 3.7.1 bis 3.7.7 werden nur jeweils 80 µl in jeden Ansatz pipettiert, d.h. die X-Achse der Eichgeraden ergibt sich in der Einheit µMol-Ansatz.

10.2 Enzymaktivitäten

Berechnung der Extinktionsdifferenz von Enzymprobe und Blindwert: ΔE
(Mittelwert der Enzymproben minus Mittelwert der Blindwerte).

Die Berechnung der Enzymaktivität A in U/ml ergibt sich nach der allgemeinen Formel

$$A = \frac{\Delta E \cdot VF}{10 \cdot ST \cdot 0,04}$$

Hierin bedeuten:

ΔE = Extinktionsdifferenz von aktiver und inaktiver Enzymprobe
 VF = Verdünnungsfaktor von aktiver und inaktiver Enzymprobe
 $10_{[min]}$ = Inkubationszeit der Enzymreaktion in Minuten
 ST = Steigung der Eichgeraden [$1/\mu\text{Mol}$]
 $0,04_{[ml]}$ = Volumen der pipettierten Enzymlösung in Milliliter

Zur Überprüfung der Reagenzien empfiehlt es sich, 3 Standardkonzentrationen parallel zu den Enzymproben anzusetzen.

10.3 Berechnungsbeispiel

Der Mittelwert der aktiven Enzymprobe beträgt: E_1 0,506

Der Mittelwert der inaktiven Enzymprobe (Blindwert) beträgt: E_2 0,270

→ Differenzwert 0,236 ΔE

Bei einem Verdünnungsfaktor von 10 und einer Steigung der Eichgeraden von 2,046 [$1/\mu\text{Mol}$] ergibt sich gegen das eingesetzte Levan eine Aktivität (U/ml) von

$$A = 0,236 \times 10 : 10 \text{ [min]} : 2,046 \text{ [1/}\mu\text{Mol]} : 0,04 \text{ [ml]}$$

2,9 $\mu\text{Mol}/\text{min} : \text{ml} = 2,9 \text{ U/ml Fructoseäquivalente}$

10.4 Messbereich

Der Messbereich liegt zwischen ΔE 0,1 bis ΔE 0,40. Werte außerhalb müssen mit einer entsprechenden Verdünnung wiederholt werden.

10.4.1 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze ergibt sich zu: $\geq 0,1 \text{ U/ml}$

10.5 Aktivität an Levanase pro Trockenmasse

10.5.1 Aktivität, bezogen auf Trockenmasse der Probe in U/g Papier ergibt sich zu:

U/ml x 100 (ml Gesamt-Extrakt) : 10 (g Papier)

U/ml = Aktivität einer 10 g Papierprobe, extrahiert in 100 ml (siehe 6).

g Papier = Trockenmasse der Papierprobe in g, berechnet auf Trockengewicht nach DIN ISO 287 (siehe 5).

10.5.2 Die Nachweisgrenze ergibt sich zu: 1 U/g Papiertrockengewicht

11. Anmerkung

In der Trockenpartie der Papiermaschine wird bei den üblichen Temperaturen die enzymatische Aktivität inaktiviert, so dass im Regelfall keine enzymatische Aktivität mehr im Papier nachzuweisen ist.

12. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf diese Vorschrift anzugeben:

Art und Bezeichnung der Probe

Beschreibung der Probenahme

Lagerung der Probe

Anzahl der Parallelbestimmungen

Einzelwerte, Mittelwert und Eichfaktoren

Feuchtigkeitsgehalt der Probe nach DIN ISO 287

Flächenbezogene Masse der Probe nach DIN ISO 536

Herkunft und Lot-Nr. des verwendeten Levans

Gegebenenfalls Abweichungen von dieser Vorschrift

Prüfdatum

13. Literatur

Modifiziert nach der Levanase-Bestimmung der Firma Henkel KGaA, 4000 Düsseldorf.