

Schülerprojekt mit ACIB 2018



Enzyme im Alltag

(gefördert durch das Talente – Programm des Bundesministeriums für Verkehr, Innovation und Transport)

Versuch zur Verwertung von Cellulose und Lignocellulose zu Bioethanol

2 g Filterpapier/Klopapier/unbehandeltes Stroh/ behandeltes Stroh (30 Minuten Kelomat, oder 30 Minuten Kelomat mit Essig/ etc. (zB Zeitungspapier (nicht ausprobiert) in 100 mL Na-Citratpuffer 50 mM, pH 5 z.B. in 300 mL Erlenmeyerkolben

+ 0.5 mL Celluclast 1.5 (Sigma-Aldrich C2730) (Enzym von der Firma Novozymes) = Cellulasen aus *Trichoderma reesei*

Mit Alufolie abdecken (Parafilm überlebt die 50°C nicht gut)

50°C übernacht (wenn möglich), stehen geht, (RT geht auch, dann eventuell 1mL Cellulase, mit 0.5 nicht getestet, ev. schütteln)

Glukosetest mit Teststreifen, nach 24 h schon gut sichtbar, Klopapier + Cellulase ca 5 g/L, bei Filterpapier etwas weniger, behandeltes Stroh noch weniger

1 Gemisch (bestes, oder nach Wahl) umfüllen in Flaschen mit Gummistopfen mit Nadel, + 2 g Trockenhefe (= *Saccharomyces cerevisiae*, ca. 1 Teelöffel)

Schlauch in Plastikröhrchen mit ca 10 mL Kalkwasser (ca. 2 g/L Ca(OH)_2 , abfiltriert), ein Kalkwasserröhrchen als Vergleich, alles im Rack, damit es gut steht (falls kein Kalkwasser verwendet werden soll wegen ätzender Wirkung: Nur Wasser, dann entfällt zwar der CO_2 -Nachweis, aber die Gasbildung kann trotzdem beobachtet werden.

Eventuell Startzeitpunkt notieren. Nach 5 Minuten bei Schwenken erste Gasblasen, nach 20 Minuten deutliche Gasentwicklung bei Schwenken, deutliche Trübung im Kalkwasser durch CO_2 , nach 30 Minuten Glukosetest → schon weniger, nach 40 Minuten deutlich weniger, bei Strohprobe keine Glukose mehr (wenn es schneller gehen soll, eventuell 3 g Hefe einsetzen)

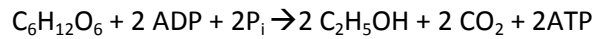
Eventuell: Probe vor und nach Fermentation nehmen (ca 1 mL in Eppi), wenn möglich abzentrifugieren, wenn nicht, macht nichts. Einfrieren. → Vermessung von Glukose und EtOH Gehalt bei ACIB auf HPLC möglich.

Entsorgung: Material kann weggespült bzw. weggeworfen werden

Vorsicht mit Kalkwasser = Ca(OH)_2 –Lösung, Schutzbrille und Handschuhe tragen! Verdünnt im Abwasser entsorgen

Siehe http://www.seilnacht.com/Chemie/ch_kalkw.html

Berechnungen :



Glukose 180 g/Mol, EtOH 46 g/Mol , CO₂ 44 g/Mol

1 Mol Glukose → 2 Mol EtOH = 180 g Glukose → 92 g EtOH also ca. max 0,5 g EtOH/ 1 g Glukose

1 Mol Glukose → 2 Mol CO₂ = 180 g Glukose → 88 g CO₂, also auch ca. max 0,5 g CO₂/ 1 g Glukose

1 % Glukose = 1g/100g ~ 1g/100mL = 10 g/L

1 g Glukose / 100mL => max. 0,5 g EtOH /100mL, Dichte: 0,789 g/mL => 0,63 mL EtOH produziert

Also erwartete Konzentration EtOH: 5 g/L oder ca. 0,1 M = 100 mM

1 g Glukose / 100 mL => ~ 0,5 g CO₂ / 100 mL = 0,011 Mol CO₂, 1 Mol Gas = 22,4 L, also 0,011 Mol = 0,25 L = **250 mL CO₂**

Information aus Wikipedia

Cellulasen

Die Gruppe der Cellulasen besteht aus drei verschiedenen Enzymtypen, deren Zusammenwirken eine rationelle Verdauung der riesigen Cellulosemoleküle (3- - 15-tausend verkettete Glucosemoleküle) ermöglicht:

1. *Endoglucanasen* (EC 3.2.1.4) spalten Cellulose in größere Abschnitte (sie können als einzige innerhalb der Celluloseketten arbeiten, aber nur innerhalb sogenannter amorpher Bereiche, wo die Cellulosemoleküle ungeordnet zueinander liegen und damit keine kristallinen Bereiche aufbauen). Dadurch erzeugen sie eine größere Anzahl von Kettenenden.

Viele Moleküle des 2. Enzyms, der *Exoglucanasen* (EC 3.2.1.91) können an diesen dann gleichzeitig - statt zeitraubend nur von einem Ende her - arbeiten und die Celluloseketten kontinuierlich verkürzen, indem sie immer zwei Zuckermoleküle als Doppelzucker (Disaccharid) Cellobiose abtrennen.

Die Moleküle des 3. Enzyms *Cellobiase* oder β -*Glucosidase* (EC 3.2.1.21) können dadurch wieder gleichzeitig arbeiten und als Abschluss des Zerlegungsprozesses schließlich die β -glycosidische Verbindung zwischen den beiden Glucose-Molekülen der Cellobiose hydrolysieren und damit die Glucose für weitere Stoffwechselprozesse (z. B. den Transport ins Blut bei der Verdauung) endgültig bereitstellen.

Verwendung und Gewinnung

Cellulasen haben mehrere kommerzielle Anwendungen in der Nahrungsmittel-, Waschmittel- und Textilindustrie. Zu diesem Zweck werden sie aus Kulturen (Submersfermentation) von Schimmelpilzen der Gattung *Trichoderma*, insbesondere *T. reesei*, isoliert. Diese kommen im Erdboden vor und gehören den Schlauchpilzen (Ascomycota) an.

In vielen Waschmitteln sind Cellulasen enthalten. In der Textilindustrie werden sie eingesetzt, um v. a. Jeansartikeln den beliebten „Used-Look“ zu geben. In der Verarbeitung von Kaffee werden sie zur Auflösung der Cellulose in den Bohnen während des Trocknungsvorganges verwendet. Des Weiteren werden Cellulasen für die Behandlung von Magen- oder Darmverschlüssen durch unverdautes Pflanzenmaterial (Phytobezoaren) und bei der Protoplastenisolierung aus Pflanzengewebe benutzt.

Verwendete Cellulasen:

Celluclast 1.5 Cellulasen aus *T. reesei*, Novozymes

1.2 g/mL Dichte, 700 EGU (endoglucanase units)/g, 40 mg/mL protein, (lt. Pareek et al, Bioresource technology, Volume 148, 2013, 70-77 Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicellulose)

Materialien:

An ACIB retour:

25 300 mL Erlenmeyerkolben

Flasche von Citratpuffer

Flasche von Kalkwasser

Flasche von Citratpuffer

1 Schachtel zur Probenaufbewahrung

Verbleiben bei Schule:

50 mL Cellulaselösung (Lagerung bei 4 °C wenn möglich)

7 Glasfläschen mit Gummikappe + 7 x Nadeln + 7x Schlauch

7 x 50 mL Plastikröhrchen mit durchbohrtem Deckel

1 Packung 50 mL Plastikröhrchen

1 Packung Eppendorftubes

Plastikpasteurpipetten

Glukoseteststreifen

Beschriftungsband

Stroh: unbehandelt, 30 Min Kelomat, 30 Min Kelomat + Essig (2 g = ca. 1 Esslöffel)

Klopapier (2 g = 3,5 Blatt)

Filterpapier (2 g = 4 Stück)

Trockengerem (2 g ist ca. 1 TL)

1 Packung Handschuhe medium, 1 Packung Handschuhe large

7 Kartonständer für Röhrchen

Kalkwasser

Citratpuffer

Cellulaseversuch

10 mL Ethanol

$789 \text{ kg/m}^3 = 789 \text{ g/L} = 0,789 \text{ kg/L} = 0,789 \text{ g/mL}$

10 mL = 7,89 g EtOH

0,45 g EtOH/g Glukose (theoretisch 0,511) \rightarrow 17,5 g Glukose \sim 0,1 Mol (180 g/mol)

100 mL: 0,1 Mol \rightarrow 1 mol/L = 180 g/L \rightarrow ZU VIEL

20 g/L = 2 g/100mL

Celluclast 1.5 Cellulasen aus *T. reesei*, Novozymes

1.2 g/mL Dichte, 700 EGU (endoglucanase units)/g, 40 mg/mL protein, (lt. Pareek et al, Bioresource technology, Volume 148, 2013, 70-77 Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicellulose)

\rightarrow 840 U/mL : 0,84 mmol/min/mL \sim 151 mg Glucose/min mit 1 mL, mit 0,5 mL: 75 mg Glucose/min

Max 2000g: 27 min

oder

1 mL auf 100 mL: 8,4 U/mL = 8,4 mM/min = 1,5 g/L Glucose/min, bei 0,5 mL/100 mL: 0,75 g/L Glucose, Start 20 g/L \rightarrow 27 min

Ethanolnachweis mit Cerammoniumnitrat geht nicht, entfärbt sich total (sowohl vor als auch nach Fermentation, unter Gasbildungirgendwas mit Cellulasen? H₂O₂?)