

Ruppersberg, Klaus; Hain, Julia; Mischnick, Petra  
**Auf der Spur der roten Farbe. Ein historischer Lactose-Nachweis  
wiederentdeckt**

*formal überarbeitete Version der Originalveröffentlichung in:*

*formally revised edition of the original source in:*

*Chemie konkret : CHEMKON 24 (2017) 4, S. 302-324*

Dokument 1 von 2



Bitte verwenden Sie in der Quellenangabe folgende URN oder DOI /  
Please use the following URN or DOI for reference:

urn:nbn:de:0111-pedocs-173785

10.25656/01:17378

<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:0111-pedocs-173785>

<https://doi.org/10.25656/01:17378>

#### Nutzungsbedingungen

Gewährt wird ein nicht exklusives, nicht übertragbares, persönliches und beschränktes Recht auf Nutzung dieses Dokuments. Dieses Dokument ist ausschließlich für den persönlichen, nicht-kommerziellen Gebrauch bestimmt. Die Nutzung stellt keine Übertragung des Eigentumsrechts an diesem Dokument dar und gilt vorbehaltlich der folgenden Einschränkungen: Auf sämtlichen Kopien dieses Dokuments müssen alle Urheberrechtshinweise und sonstigen Hinweise auf gesetzlichen Schutz beibehalten werden. Sie dürfen dieses Dokument nicht in irgendeiner Weise abändern, noch dürfen Sie dieses Dokument für öffentliche oder kommerzielle Zwecke vervielfältigen, öffentlich ausstellen, aufführen, vertreiben oder anderweitig nutzen.

Mit der Verwendung dieses Dokuments erkennen Sie die Nutzungsbedingungen an.

#### Terms of use

We grant a non-exclusive, non-transferable, individual and limited right to using this document.

This document is solely intended for your personal, non-commercial use. Use of this document does not include any transfer of property rights and it is conditional to the following limitations: All of the copies of this documents must retain all copyright information and other information regarding legal protection. You are not allowed to alter this document in any way, to copy it for public or commercial purposes, to exhibit the document in public, to perform, distribute or otherwise use the document in public.

By using this particular document, you accept the above-stated conditions of use.

#### Kontakt / Contact:

peDOCS  
DIPF | Leibniz-Institut für Bildungsforschung und Bildungsinformation  
Informationszentrum (IZ) Bildung  
E-Mail: [pedocs@dipf.de](mailto:pedocs@dipf.de)  
Internet: [www.pedocs.de](http://www.pedocs.de)

Mitglied der

  
Leibniz-Gemeinschaft

# Auf der Spur der roten Farbe: Ein historischer Lactose-Nachweis wiederentdeckt

Ruppersberg, K.<sup>1</sup>, Hain, J.<sup>2</sup>, Mischnick, P.<sup>3</sup>

1) Leibniz-Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften und Mathematik an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Abt. Chemiedidaktik – Prof. Dr. Ilka Parchmann), Olshausenstr. 62, 24118 Kiel, [ruppersberg@ipn.uni-kiel.de](mailto:ruppersberg@ipn.uni-kiel.de)

2) Otto-Diels-Institut für Organische Chemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Arbeitsgruppe Lindhorst, Otto-Hahn-Platz 4, 24118 Kiel, [jhain@oc.uni-kiel.de](mailto:jhain@oc.uni-kiel.de)

3) TU Braunschweig, Fakultät für Lebenswissenschaften, Institut für Lebensmittelchemie, Schleinitzstr. 20, 38106 Braunschweig, [p.mischnick@tu-braunschweig.de](mailto:p.mischnick@tu-braunschweig.de)

*Hinweis: Agnes-Pockels-SchülerInnenlabor ist ein Eigenname, der ohne Rücksicht auf die örtlich geltende Genderschreibweise in der vorliegenden Form geschrieben wird.*

## Zusammenfassung:

Chemiegeschichte(n), Medizin und Grundlagenforschung – diese drei Zugänge für ganz unterschiedliche Interessen- und Motivationslagen bei Schülerinnen und Schülern lassen sich über einen gemeinsamen Kontext zusammenführen, in dessen Mittelpunkt ein roter Farbstoff steht! Schwangerschaftsdiabetes und Lactoseunverträglichkeit erfordern geeignete Nachweise, deren Entdeckung, Nutzung und Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen spannende Fragen für den Chemieunterricht im Themenfeld Kohlenhydrate bereithalten, verbunden mit einem Blick zurück in europäische Forschungsgeschichte(n) und mit einem Blick nach vorn auf heute noch offene Forschungsfragen.

**Stichworte:** Lactose, Maltose, Chemieunterricht, Nachweisreaktion, Wöhlk-Malfatti-Probe

**Abstract:** Chemistry history (s), medicine and basic research - these three approaches can be combined using a common context with a red dye in the center when dealing with students' different interests and motivation levels!

The appropriate evidence, discovery, use and elucidation of the underlying mechanisms of pregnancy diabetes and lactose intolerance provide exciting questions for chemistry lessons in the field of carbohydrates, when keeping in mind European research history (s) and today's open research questions.

**Keywords:** Lactose, Maltose, Chemistry Education, Detection reaction, Woehlck-Malfatti-Test

## 1 Eine europäische Detektivgeschichte: Warum ist die Wöhlk-Malfatti-Probe interessant für den Unterricht?

Einen kontextbasierten, alltagsrelevanten Zugang zur Chemie der Kohlenhydrate zu finden ist heute leicht möglich: Vor dem Hintergrund einer zunehmenden Sensibilität gegenüber Nahrungsmittelunverträglichkeiten, bspw. der Lactoseunverträglichkeit, lassen sich eine ganze Reihe von motivierenden Fragen aufwerfen:

- Wie unterscheiden sich verschiedene Zucker, in welchen Lebensmitteln kommen welche Kohlenhydrate vor?
- Wie weist man heute Diabetes oder Lactosurie nach, wie wurde dies früher gemacht?
- Weshalb tritt Lactoseunverträglichkeit in verschiedenen Gebieten gehäuft (nicht) auf?

Im Rahmen des hier zugrundeliegenden Projekts war es eigentlich das Ziel, einen einfachen und für Schülerinnen und Schüler selbst durchführbaren Lactosenachweis für einen Schulversuch aufzubereiten – herausgekommen sind neben diesem Experiment eine interessante Reise durch die europäische Chemiegeschichte, grundlegende Fragestellungen zur Aufklärung des tatsächlichen Mechanismus der Farbreaktion und ein Projekt in einem Schülerlabor. Wie so oft in der Forschung

sind Resultate und Entwicklungen nicht immer geplant, führen aber oftmals zu interessanten und unerwarteten Kooperationsmöglichkeiten und Folgefragen, die mit Hilfe der Arbeitsblätter im Anhang dieses Artikels auch von Schülerinnen und Schülern weiter verfolgt werden können.

Ausgangspunkt war die so genannte „Wöhlk-Malfatti-Probe“, die einst für Krankenhaus- und Arztlabore von großer Bedeutung war [1]. Es handelt sich dabei um einen optisch ansprechenden, von Schülerinnen und Schülern gut durchführbaren nasschemischen Nachweis für den Zucker Lactose (aber auch andere 1,4-verknüpfte Disaccharide, wie Maltose und Cellobiose), der mehr als 100 Jahre nach seiner Einführung auch für die Forschung noch offene Fragen bereit hält [2-4]. In einer Zusammenarbeit zwischen Chemiedidaktik, Organischer Chemie, Lebensmittelchemie und einem Schülerlabor wurde dieses historische Experiment genauer unter die Lupe genommen und mit Hilfe von FachdidaktikerInnen, FachwissenschaftlerInnen und am Ende sogar SchülerInnen für den Chemieunterricht bearbeitet.

## **2 Dem Mechanismus der Wöhlk-Probe auf der Spur – was steckt dahinter?**

Ein Nachweis für Milchzucker, die Lactose, ließ sich in der Literatur finden: die so genannte Wöhlk-Probe [5]. Dieser funktionierte gut und schien auch für Schülerversuche geeignet – bis der Versuch unternommen wurde, das Ergebnis mit einer einfachen mechanistischen Deutung zu verbinden!

Eine zunächst vorgenommene vertiefte Literaturrecherche ergab, dass sich auch andere Forscher am Wöhlk-Mechanismus die Zähne ausgebissen haben, da der Farbstoff instabil ist und sich bisher nicht isolieren ließ [6]. Dennoch führte gerade diese Recherche zu interessanten Quellen und Informationen über die Nutzung der Reaktion, auch ohne die Struktur des Farbstoffs und den Mechanismus seiner Bildung genauer zu kennen. Eine anschauliche und alltagsrelevante Aufbereitung des historischen Experiments aus der Pharmazeutischen Lehranstalt Kopenhagen, das in ähnlicher Form auch in St. Petersburg (Umikoff 1896 [7], Sieber 1900 [8]) und später in Dublin (Fearon, 1942 [9]) durchgeführt worden war, kann problemlos auch mit Schulexperimenten realisiert werden [2]. Ergänzend genutzt werden können Quellen aus Amsterdam, denn auch dort war die rote Farbe schon aufgefallen, aber nicht weiter verfolgt worden (van Leent 1894, publiziert in Basel, [10]).

Angestoßen durch diese mehrfache Entdeckung bei gleichzeitig fehlender klarer Deutung des Mechanismus wurden die Autorinnen und Autoren selbst noch einmal forschend tätig, und zwar in einem Team aus einem Lehrer und Chemikerinnen aus den Bereichen der Organik und Lebensmittelchemie. Über einen Zeitraum von mehreren Wochen wurden viele gemeinsame Experimente durchgeführt, die eine Annäherung an den Mechanismus bringen sollten, und überraschende Fehler in Publikationen zu diesem Thema aufzeigten. Durch die Diskussionen wurde die Komplexität des Themas mehr und mehr offensichtlich und es stellte sich die Frage, ob es überhaupt „einen Wöhlk-Farbstoff“ gibt oder ob es sich nicht letztlich um ein Gemisch handelt. Die nachfolgenden Ausführungen bieten einen kurzen Einblick in diesen Ausflug in die Grundlagenforschung.

### ***Von der Überprüfung historischer Befunde ...***

Bei der Suche nach einem Mechanismus für die Wöhlk-Malfatti-Reaktion gab es zunächst einige Unstimmigkeiten zu klären. So sollte der prachtvollere rote Farbstoff „Pyrrolrot“ heißen und durch Oxidation von Galactose zu Schleimsäure (auch: Galactarsäure, Mucinsäure) gebildet werden [11-13]. Welche Anhaltspunkte können zur Aufklärung des tatsächlichen Reaktionsmechanismus herangezogen, welche ausgeschlossen werden?

Beim Nachforschen fand sich eine grundlegende Fehlannahme: „Durch das Kochen im Wasserbad mit NaOH und NH<sub>3</sub> erfolgt eine hydrolytische Spaltung von Lactose in D-Glucose und D-Galactose.“ [13]. Unter alkalischen Bedingungen ist aber keine Hydrolyse zu erwarten, sondern hier finden Umlagerungen statt, wie sie schon 1885 von Cornelis Adriaan Lobry van Troostenburg de Bruyn und Willem Alberda van Ekenstein beschrieben wurden [14]. Hydrolysieren lässt sich Lactose entweder mit dem Enzym  $\beta$ -Galactosidase („Lactase“) oder z.B. durch einstündiges Erhitzen bei 90 °C mit 1,5-molarer Salzsäure, also unter viel heftigeren Bedingungen als bei der Hydrolyse von Saccharose [15].

Anstelle einer hydrolytischen Spaltung in die Endprodukte Glucose und Galactose kann aber im Reaktionsverlauf zu Umlagerungen und Eliminierungen kommen, wie wir noch sehen werden.

An anderer Stelle heißt es in Bezug auf die Wöhlk-Reaktion: „Galaktose wird durch Luftsauerstoff zu Schleimsäure (eine Dicarbonsäure) oxidiert (...)“ [12]. Auch dies konnten die Autoren widerlegen: Führt man die Wöhlk-Probe unter inerter Atmosphäre mit entgasten Komponenten durch, ist kein Unterschied in der Farbentwicklung zu erkennen, Sauerstoff ist somit für die Reaktion nicht essenziell. Wird die Reaktion jedoch im wasserfreien Milieu durchgeführt (die wässrige Ammoniaklösung wird dabei durch methanolisches Ammoniak ersetzt, 60 °C, Rückflusskühlung), ist nach anfänglicher Schwerlöslichkeit der Lactose lediglich eine Gelbfärbung zu beobachten (siehe Abb. 1). Selbst nach einer Stunde Reaktionszeit bleibt die markante rote Farbe aus. Das Vorhandensein von Wasser ist also offensichtlich wichtig für die Reaktion [16].

Die Pyrrolbildung aus Schleimsäure, wie sie im bekannten Lehrbuch von Gattermann beschrieben wird, setzt Temperaturen zwischen 170 °C und 300 °C voraus und findet unter Kohlenstoffdioxidabspaltung statt, während die Wöhlk-Probe bei nur 60 °C – 80 °C stattfindet und keine Kohlenstoffdioxidentwicklung zu beobachten ist [17].

Schleimsäure (Mucinsäure) und deren Salz Ammoniummucate lassen sich zwar aus Lactose herstellen, ansonsten gibt es aber keinen weiteren Zusammenhang zur Wöhlk-Probe.



**Abb. 1:** Reaktionsprodukt von Lactose und wasserfreiem Ammoniak, 60 °C, Rückflusskühlung.

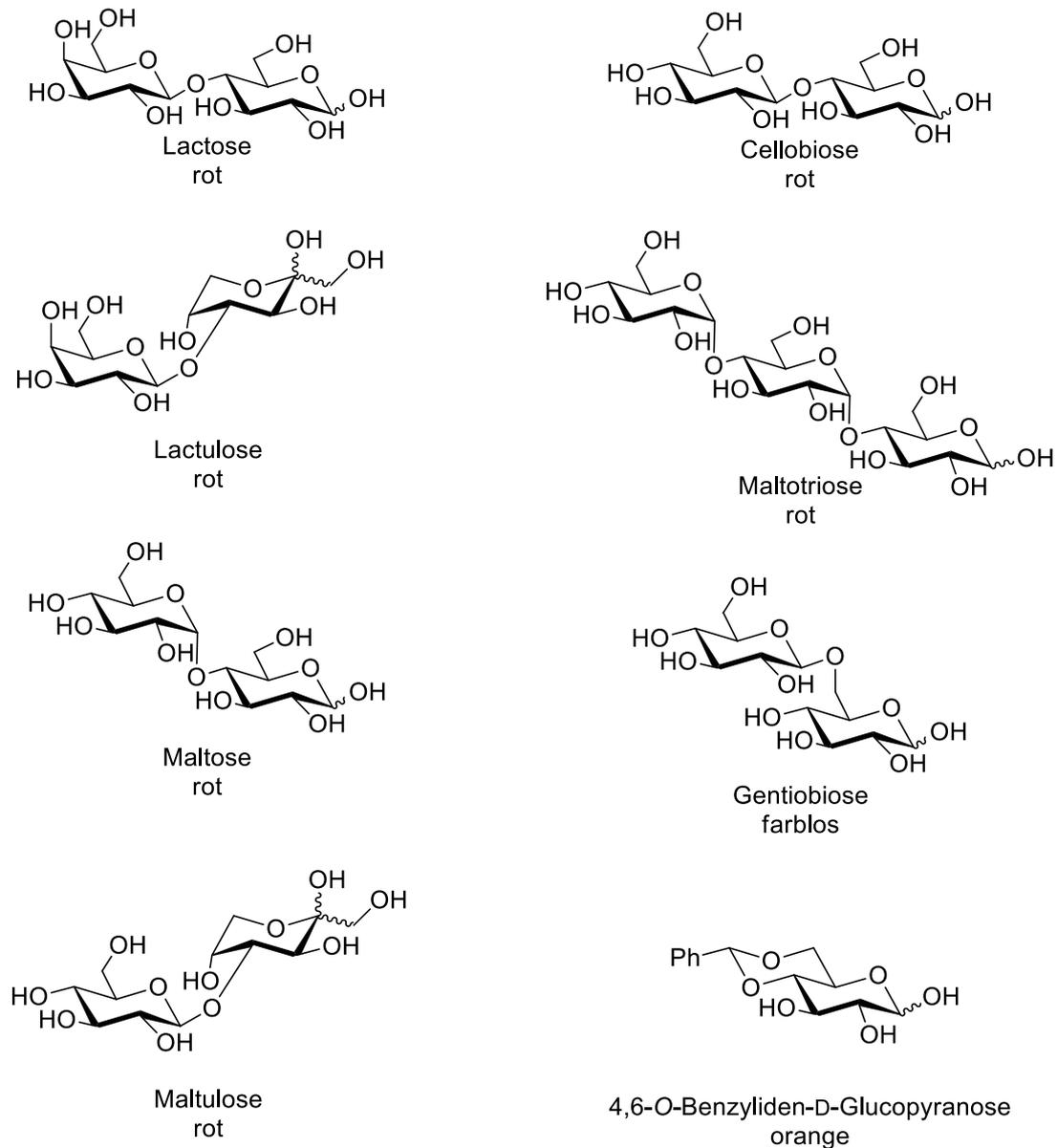
Wie lässt sich die Reaktion genauer aufklären? Dazu wurden weitere systematische Reihenuntersuchungen mit verschiedenen Kohlenhydraten durchgeführt.

#### **... zu systematischen Analysen der Wirksamkeit ...**

Die bisher getesteten Zucker (s. Abb. 2), die im Wöhlk-Test die charakteristische rote Farbe ergaben, haben eines gemeinsam: Es sind reduzierende Disaccharide, die über die OH-Gruppe in Position 4 verknüpft sind.

Die Stereochemie der Glycosidbindung ( $\alpha$ , wie in Maltose oder  $\beta$ , wie in Lactose und Cellobiose) scheint hingegen keine Rolle zu spielen. Die Stereochemie am nicht reduzierenden Ende (Galactose in Lactose versus Glucose in Maltose und Cellobiose) wirkt sich nicht erkennbar auf die Farbstoffbildung aus. Es stellt sich folglich die Frage, ob die Blockierung der OH-Gruppe am C-4 den Reaktionsverlauf so „kanalisiert“, dass letztlich ein lachsroter Farbstoff entsteht, der von Wöhlk als „Krapprot“ bezeichnet wurde und durch das linke Spektrum in Abb. 3 beschrieben werden kann. Daher wurden weitere verfügbare Zucker getestet, darunter Lactulose (Gal- $\beta$ -1,4-Fru), Maltulose (Glc- $\alpha$ -1,4-Fru), Gentiobiose (Glc- $\beta$ -1,6-Glc) und Maltotriose (Glc- $\alpha$ -1,4-Glc- $\alpha$ -1,4-Glc) (s. Abb. 2). Auch ein geschütztes Monosaccharid, die 4,6-O-Benzyliden-D-glucopyranose, stand zur Verfügung. Das positive Ergebnis für Lactulose und Maltulose bestätigte noch einmal, dass die im Alkalischen zu erwartende Isomerisierung der Glucoseeinheit zur Fructose ohnehin im Rahmen der Reaktion abläuft, zumindest aber, zumal

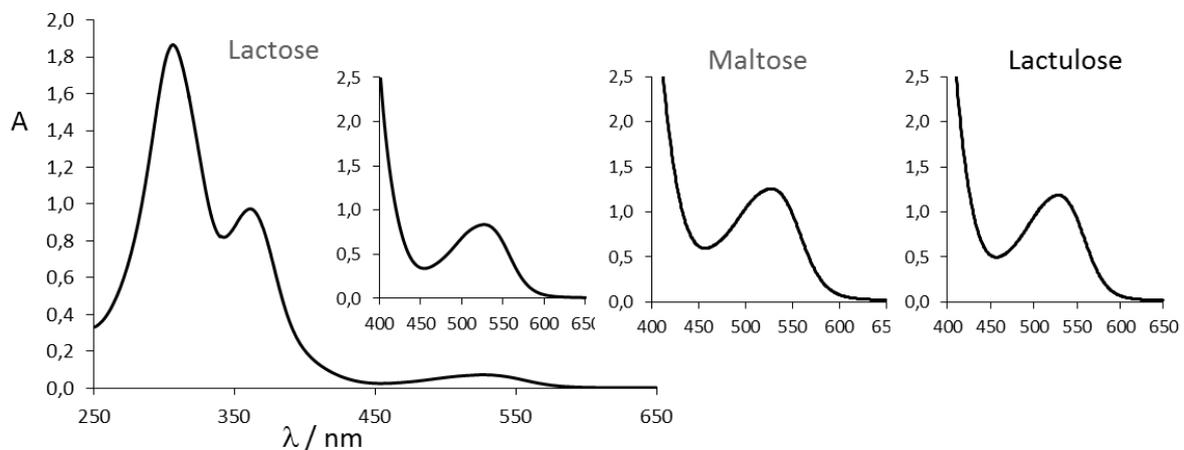
reversibel, die Reaktion nicht erkennbar verändert. Auch Maltotriose reagierte positiv, was anzeigt, dass es egal ist, ob die Kette um eine weitere Glucoseeinheit verlängert wird. Die 1,6-verknüpfte Gentiobiose zeigt hingegen keine rote Farbe, obwohl sie auch ein reduzierendes Disaccharid ist. Das 4,6-überbrückte und so an zwei Positionen geschützte Glucosederivat ergab eine orange Färbung. Eine fotometrische Überprüfung ergab keine Absorption, die auf den typischen roten Farbstoff schließen ließe. Da die Benzylidenbrücke den Zucker in seiner Flexibilität einschränkt und nicht nur die 4-Position, sondern auch die 6-Position schützt, kann dieser Befund die Frage, ob 4-OH lediglich blockiert sein muss, egal ob mit einem weiteren Zucker oder einer Schutzgruppe, leider nicht abschließend beantworten.



**Abb. 2:** Übersicht über die Formeln der hier erwähnten Moleküle sowie deren farblisches Ergebnis im Wohlk-Test.

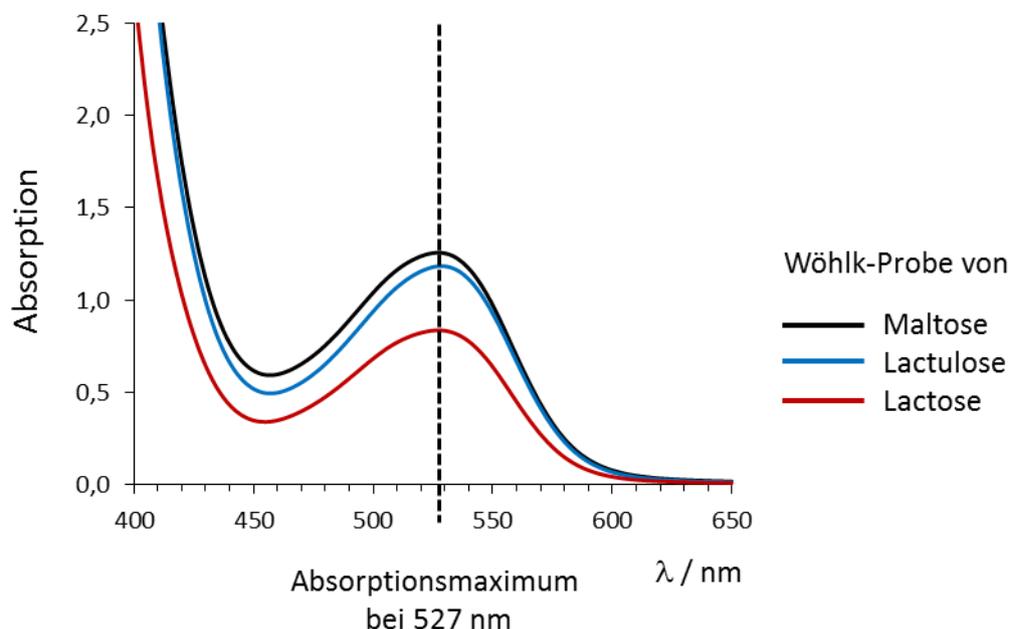
Wenngleich der visuelle Eindruck bei den rot gefärbten Proben unabhängig vom Substrat gleich war, sollte ein Vergleich der UV/Vis-Spektren zeigen, ob sie auch dasselbe Absorptionsverhalten zeigen.

Alle rot gefärbten Lösungen zeigten sehr intensive Absorptionen bei 306 und 362 nm sowie das für den roten Farbeindruck verantwortliche Maximum bei 527 nm (siehe Abb.3a).



**Abb.3a:** UV/Vis-Spektren der „Wöhlk-Produkte“ von Lactose (volles Spektrum mit vergrößertem Ausschnitt im für die rote Farbe verantwortlichen Bereich), Maltose und Lactulose (nur Ausschnitt).

Die Absorptionsbande bei 527 nm ist so symmetrisch und für alle drei Zucker identisch (Abb. 3b), dass man eine einheitliche Komponente vermuten kann. Auch die positiv reagierenden Zucker Cellobiose, Maltulose und Maltotriose zeigen dieses Absorptionsspektrum.



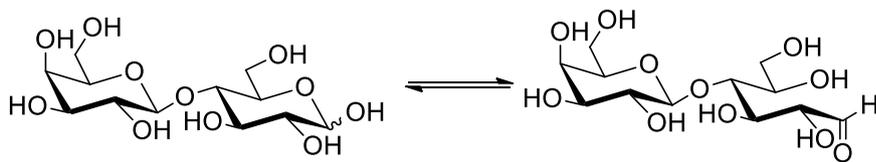
**Abb. 3b:** Überlagerte Ausschnitte der UV/Vis-Spektren der „Wöhlk-Produkte“ von Lactose, Maltose und Lactulose, Vergrößerung der Absorption des roten Farbstoffs bei 527 nm.

### ... und mechanistischen Überlegungen

Wie kommt man nun von den Beobachtungen zu mechanistischen Überlegungen? Auf Basis der bis dahin gesammelten Beobachtungen konnten die im Folgenden ausgeführten Erkenntnisse festgehalten werden und diese dienten im Anschluss als Ausgangspunkt für weitere Überlegungen zum Mechanismus der Wöhlk-Probe. Die Autoren gehen davon aus, dass die Lactose (chemisch korrekt: 4-O-β-D-Galactopyranosyl-D-glucopyranose) unter den Versuchsbedingungen nicht

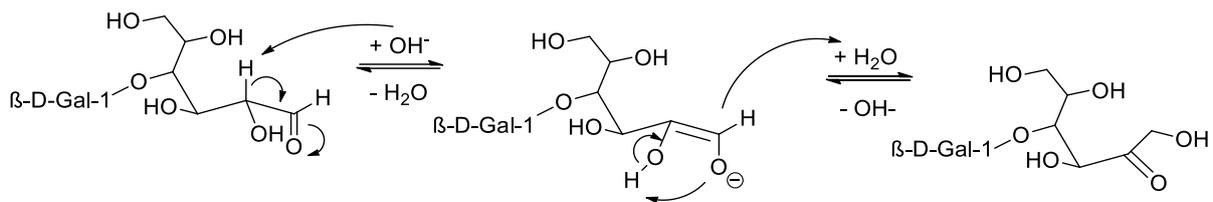
hydrolysiert wird. Damit in Einklang steht, dass eine Mischung von Glucose und Galactose im Experiment lediglich eine Gelbfärbung zeigt (siehe Abb. A2.6). Weiterhin kann die Galactose auch durch Glucose ersetzt sein. Dies wird dadurch bewiesen, dass die „prachtvolle rote Farbe“ auch bei Cellobiose und Maltose entsteht. Die positiven Reaktionen von Maltose und Maltotriose zeigen, dass auch die Stereochemie der 1,4-Glycosidbindung keine Rolle spielt.

In wässriger Lösung öffnet und schließt sich das Halbacetal am reduzierenden Ende, sodass im Gleichgewichtszustand neben den anomeren Pyranosen und ggf. auch Furanoseformen auch eine offenkettige Form mit reaktionsfreudiger Aldehydgruppe vorliegt (Mutarotation, Abb. 4).



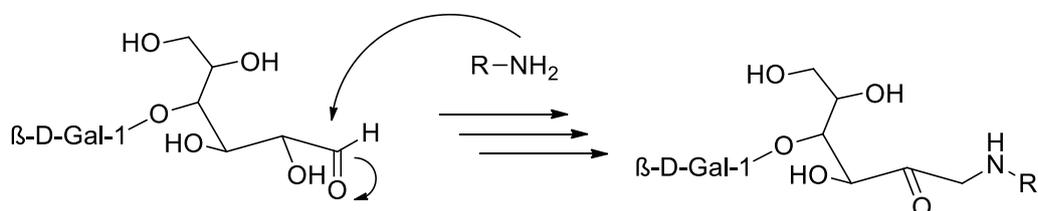
**Abb. 4:**  $\alpha,\beta$ -Lactose (links) im Gleichgewicht mit der offenkettigen Form der Lactose (rechts).

Im alkalischen Milieu kann es nun zu einer Vielzahl von Reaktionen und Reaktionsprodukten kommen: a) Durch eine Keto-Enol-Umlagerung des Aldehyds, auch Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerung genannt [14], entsteht eine Keto-Gruppe an C-2 (Abb. 5). Die Rückreaktion zur Aldose kann sowohl zur *gluco*- als auch zur *manno*-Konfiguration führen.



**Abb. 5:** Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerung von Lactose zu Lactulose im alkalischen Milieu.

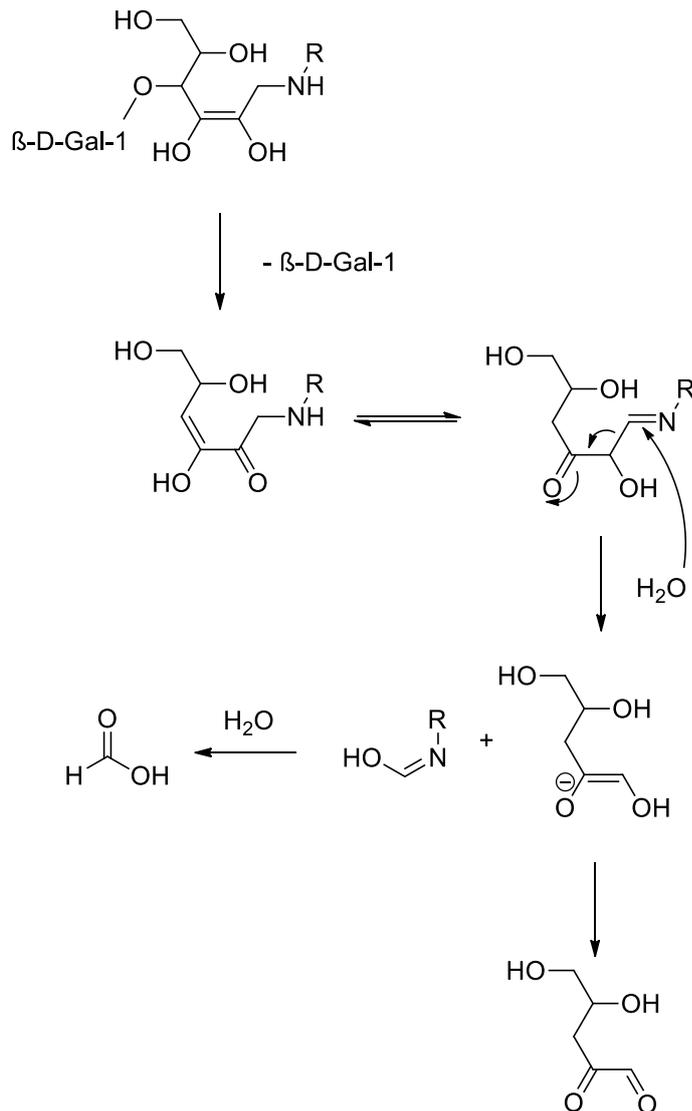
b) Bei der Wöhlk-Reaktion wird aus Aldehyd (bzw. ggf. aus der Keto-Form, s. a), was hier nicht weiter betrachtet werden soll) und Ammoniak ein Aminal gebildet, das nach Wasserabspaltung in die Schiff'sche Base (Imin) übergeht. Durch Amadori-Umlagerung – analog der Maillard-Reaktion zwischen Zucker und Aminosäuren [18, 19] - entsteht daraus die 1-Amino-1-desoxy-ketose, im Fall von Ammoniak ein primäres Amin, das dann weitere Folgereaktionen eingehen kann. Bei Einsatz von Methylamin (in Form von Methylammoniumchlorid) gemäß Fearon's Test [9], ebenso bei Sieber [8], bildet sich analog ein sekundäres Amin (Abb. 6).



**Abb. 6:** Reaktion von Lactose mit Ammoniak ( $R=H$ ) bzw. Methylamin ( $R = CH_3$ ).

Aber nicht nur Methylamin liefert eine Reaktion, die der Wöhlk-Probe ähnlich ist: Zur Bildung des roten Farbstoffs tragen ganz allgemein primäre Amine bei, die einen elektronenliefernden Rest besitzen (Methylgruppe, Ethylgruppe, Benzylgruppe, ...). Darüber berichteten auch schon Sieber und Fearon [siehe 1, im Original: 8,9].

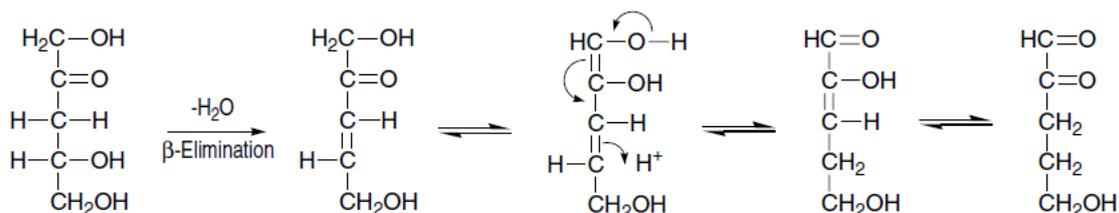
c) Auch Cellobiose, Maltulose, Maltose und Maltotriose liefern das lachsrote „Wöhlk-Produkt“. Diese Beobachtung legt nahe, dass der Schutz an C-4 der reduzierenden Glucoseeinheit durch einen offensichtlich austauschbaren Zucker die Reaktion in eine bestimmte Bahn lenkt. Hier setzte eine gezielte Literaturrecherche an, deren Ergebnis diese Vermutung stützt. Hollnagel und Kroh berichteten 2002 über die Umsetzung von Glucose, Maltose und Maltotriose in Abwesenheit und in Gegenwart der einfachsten Aminosäure Glycin [20]. Nur bei Maltose und Maltotriose, nicht aber bei Glucose und verstärkt in Gegenwart der Aminokomponente wird die Bildung von 3-Deoxypentosulose (3-DP) beobachtet. Der Zucker an O-4 fungiert dabei als Abgangsgruppe, die die Reaktion in Richtung des 1-Amino-1,4-dideoxyhexosons (1,4-DDH) lenkt (s. Abb. 7).



**Abb. 7:** Bildung von 1-Amino-1,4-dideoxyhexose (1,4-DDH) und Weiterreaktion zu 3-Deoxypentosulose (3-DP) nach Hollnagel und Kroh 2002 [20]).

Durch Angriff von  $OH^-$  kann die tautomere Iminform unter C-C-Spaltung 3-DP liefern. Bereits 2000 beschrieben Hollnagel und Kroh die ausgeprägte Bildung des Vorläufers 1,4-DDH als Eliminierungsprodukt von Maltose [21]. Henle et al. beschreiben in verschiedenen Arbeiten ebenfalls besondere Reaktionswege von 1,4-Disacchariden mit Aminosäuren [22-24]. Dabei weisen sie auch eine 3,4-Dideoxypentosulose (3,4-DDP) nach, deren Entstehung man sich, alternativ zur Oxidation zur 3-DP, durch  $\beta$ -Eliminierung von Wasser aus der Vorstufe der 3-Desoxy-pentulose in Abb. 7 vorstellen

kann. Solche  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen können mit oder auch ohne Einbau von Stickstoff zu Heteroaromaten wie z.B. Furanen, Pyrrolen oder Oxopyridinderivaten führen, die als Vorstufen höhermolekularer farbiger Verbindungen denkbar sind. Für weitere Forschungen wäre es daher interessant, diese bekannten Intermediate herzustellen und für die Wöhlk-Reaktion einzusetzen. Es sollte erwähnt werden, dass die genannten Modellstudien bei neutralem pH durchgeführt wurden. Bei dem für die Wöhlk-Reaktion notwendigen alkalischen pH mag der Reaktionsweg anders verlaufen. Aber diese Literaturbeispiele unterstützen sehr stark die Hypothese, dass eine Abgangsgruppe an Position 4 die entscheidende Weichenstellung für die gleiche Reaktion der 1,4-verknüpften Disaccharide darstellt.

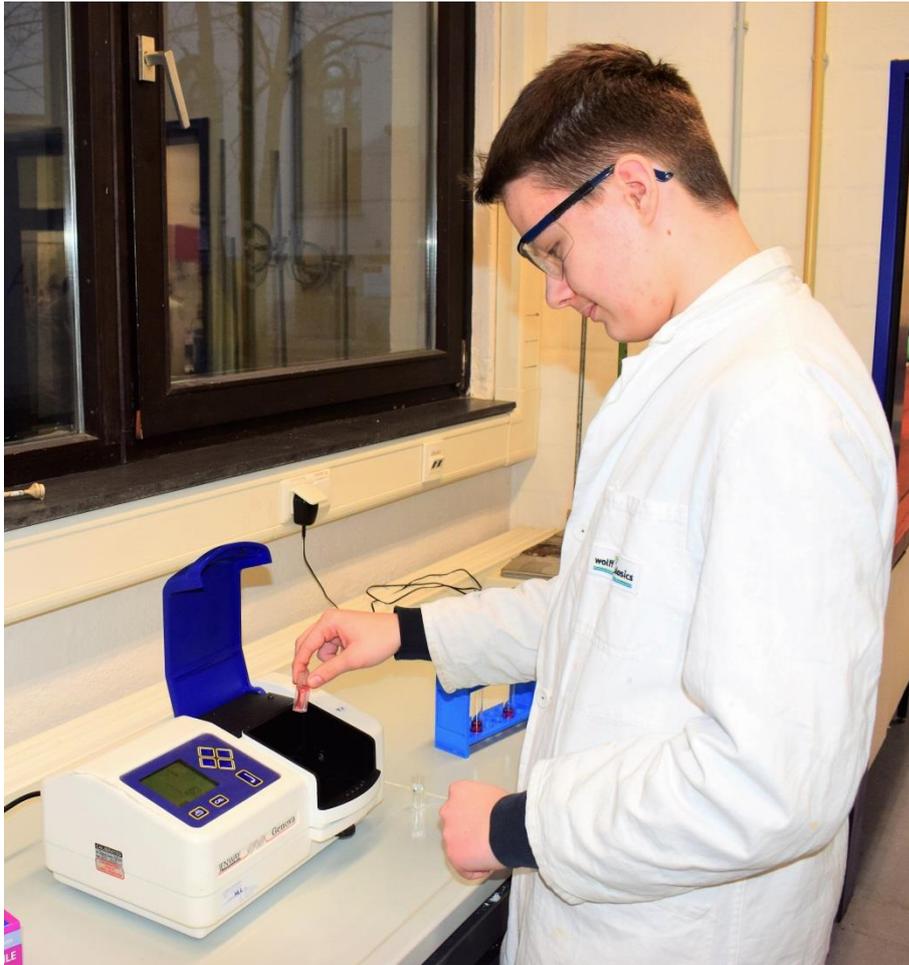


**Abb. 7a:**  $\beta$ -Elimination und Reaktionsweg zur 3,4-Dideoxypentose (nach Mavrik/Henle [22]).

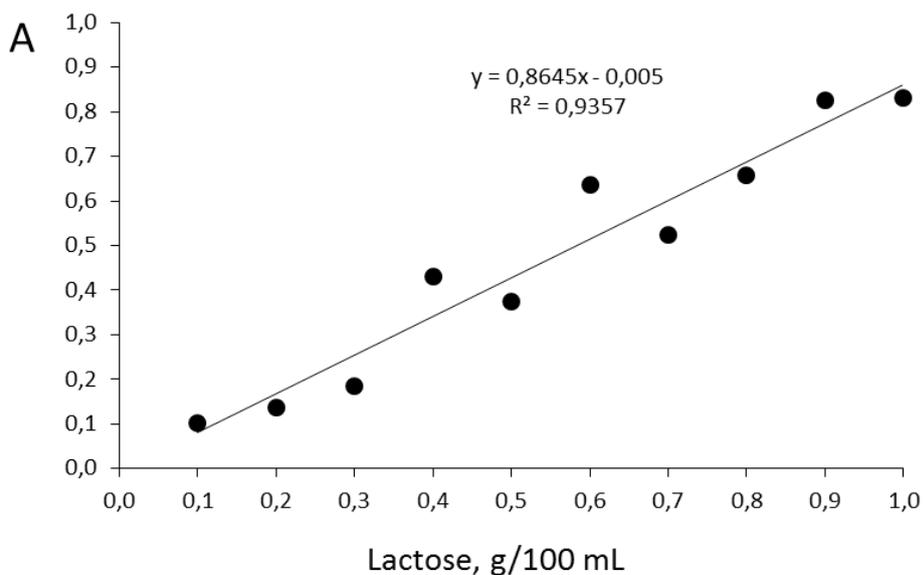
### 3 Von wissenschaftlichen Untersuchungen zu Schülerforschungsprojekten

#### **Exemplarische Darstellung der Bearbeitung des Themas in einer ForscherInnen-AG**

Ein Ausgangspunkt für die weitere Erarbeitung des Nachweises bietet der Befund, dass es bei Menschen unterschiedlich ausgeprägte Lactoseunverträglichkeiten gibt: Bis zu 240 mL Milch, entsprechend etwa 12 g Lactose, werden von Menschen, die über Lactoseintoleranz klagen, verteilt über den Tag oftmals vertragen, ohne dass Beschwerden auftreten [25]. Für eine quantitative Bestimmung sollte daher die Konzentrationsabhängigkeit der Farbstoffbildung fotometrisch untersucht werden. Dieses Projekt wurde von einem Schüler der ForscherInnen-AG am Agnes-Pockels-SchülerInnen-Labor an der TU Braunschweig durchgeführt. Die Schülerinnen und Schüler dieser AG kommen seit der 4. Grundschulklasse wöchentlich an diesen außerschulischen Lernort, wo sie nach Anfänger- und Fortgeschrittenen-AG schließlich in die gemischte ForscherInnen-AG münden und dort ihren eigenen kleinen Projekten nachgehen können. Die AGs wurden vor 10 Jahren mit Unterstützung des FCI (Fonds der Chemischen Industrie) ins Leben gerufen und haben sich als ein Projekt mit langem Atem bewährt, in dem die Kinder und dann Jugendlichen im Labor heimisch werden, experimentelles Geschick erwerben und die wissenschaftliche Arbeitsweise lernen sollen. Nachdem das Interesse von Paul Gardlos (14), Schüler der 8. Klasse, geweckt war, widmete er sich Woche für Woche der Aufnahme einer Kalibrationskurve mit definierten Lactoselösungen, die dann unter den von Ruppertsberg und Hain angegebenen Bedingungen [2] umgesetzt wurden. Es ergab sich ein linearer Absorptionsbereich im Bereich von 0,1 – 1,0%igen Lösungen mit Absorptionen im Bereich 0-1. Abb. 8 zeigt Paul beim Messen an dem kleinen Fotometer des Agnes-Pockels-SchülerInnenlabors, Abb. 9 die von ihm erstellte Kalibrationsgerade.



**Abb. 8:** Schüler im Agnes-Pockels-SchülerInnenlabor bei der Messung am Fotometer zur Erstellung der Kalibrationsgeraden.



**Abb. 9:** Kalibrationsgerade für den aus Lactose gebildeten roten Farbstoff der Wöhlk-Probe; 2 mL Lösung, der angegebenen Lactosekonzentration wurden mit 2 mL 10%igem Ammoniak und 3 Tropfen 1-molarer KOH-Lösung umgesetzt und 15 Min. im Wasserbad bei 70 °C erwärmt. Die Absorption wurde dann bei Wellenlängen zwischen 523 oder 527 nm gemessen. Die einzelnen

Punkte sind die Ergebnisse von Messungen an verschiedenen AG-Tagen im Agnes-Pockels-SchülerInnenlabor.

Dass man bei einer solchen empirischen Methode, wie sie für die Lebensmittelchemie bis zur Entwicklung moderner instrumenteller Analytik typisch war, die Bedingungen strikt einhalten muss, konnte auch der Schüler feststellen, wenn er bei verschiedenen AG-Terminen einzelne Lactose-Lösungen umsetzte, deren Ergebnisse nicht immer ganz zusammenpassten (Abb. 8). So spielen der pH-Wert und die Temperatur eine wichtige Rolle für die Geschwindigkeit der Farbstoffbildung, die nach einer exakt einzuhaltenden Reaktionszeit gemessen werden muss. Immer exakt 70 °C in einem einfachen Wasserbad ohne Thermostat zu halten, ist nicht so einfach.

Eine ähnliche Kalibrationsgerade, allerdings nach Umsetzung mit Methylamin anstelle von Ammoniak, hatten 1949 Malpress und Morrison veröffentlicht [16]. Angeregt durch diese Arbeit untersucht der Schüler jetzt die Abhängigkeit der Farbstoffbildung von verschiedenen Parametern.

Die bisherigen Ergebnisse geben Anregungen für weitere kleine Projekte, die von Schülerinnen und Schülern in einer AG wie am Agnes-Pockels-SchülerInnenlabor oder in Facharbeiten bearbeitet werden können. Eine quantitative Untersuchung der Maltooligosaccharide könnte aufzeigen, ob derselbe molare Umsatz wie bei Maltose erfolgt oder ob die Ausbeute an Farbstoff höher ausfällt, weil z.B. im Zuge der Farbstoffbildung Maltose freigesetzt wird und ebenfalls nach Wöhlk reagieren kann. Natürlich kann die Methode auch zur Bestimmung der Lactosegehalt in Produkten angewandt werden. Hinsichtlich der Struktur des roten Farbstoffs und der Bedeutung der verknüpften 4-Position sind ebenfalls weitere Untersuchungen möglich, die den Forschergeist von Schülerinnen und Schülern inspirieren könnten. Auf jeden Fall bietet sich hier ein ästhetisch ansprechendes, von Schülerinnen und Schülern mit einfachen Mitteln durchführbares Experiment, das zu weiteren Expeditionen in die Forschung einlädt (siehe hierzu auch Arbeitsblätter 1-6 im Anhang dieses Artikels).

#### **4 Zusammenfassung und Mehrwert für die Schule**

##### ***Stand der Überlegungen:***

Obwohl das eigentliche Ziel, das Reaktionsprodukt und den Reaktionsmechanismus der Wöhlk-Reaktion zu finden, noch nicht erreicht werden konnte, ergab sich eine ganze Reihe von Ergebnissen, welche den kontextorientierten Experimentalunterricht erheblich bereichern: Durch die Auswahl von verschiedenen Milchprodukten, die wegen der Gefahr einer Verfälschung des Ergebnisses oder Störung der Reaktion möglichst keine Farbstoffe oder Zuckerzusätze beinhalten sollen, kann nun anschaulich deren unterschiedlicher Lactosegehalt gezeigt werden. Darüber hinaus wird Chemiegeschichte mit umfangreichem Arbeitsmaterial, teilweise als Faksimile-Abdruck, als spannende Detektivarbeit herausgehoben. Weiterhin wird wissenschaftliches Arbeiten durch die Kooperationsbeispiele für Schülerinnen und Schüler transparent und nachvollziehbar gemacht.

##### ***Mehrwert für die Schule:***

Der Tatsache, dass Interessen von Schülerinnen und Schülern sehr unterschiedlich ausgeprägt und aktiviert werden können, kann in diesem Thema in vielfacher Weise Rechnung getragen werden. Für geschichtlich und an Personen Interessierte bieten die historischen Entwicklungen, die das häufig auftretende Phänomen paralleler wissenschaftlicher Erkenntnisse in Abhängigkeit von den jeweiligen gesellschaftlichen Bedarfen zeigen, einen Zugang – in diesem Fall etwa die Diagnose der Schwangerschaftsdiabetes und der Lactosurie, die theoretischen und methodischen Zugänge sowie die Rollen verschiedener Wissenschaftler und (seltener) Wissenschaftlerinnen (Arbeitsblatt 2). An chemischen Grundlagen Interessierte können mechanistische und analytische Fragen weiter untersuchen, wie nachfolgend am Beispiel einer ForscherInnen-AG skizziert wird (Arbeitsblätter 1, 3, 4, 5). Die Ausgangsfrage der Lactoseunverträglichkeit führt schließlich auch in den Kontext von Medizin, Gesundheit und Gesellschaft und bietet damit interessante fächerverbindende Zugänge –

nicht nur zur Biologie, sondern auch in die Geschichte und Geografie über die Rolle von Milchviehwirtschaft und dem Vorkommen der Verträglichkeit für Milchzucker (Arbeitsblatt 6).

Als besonderes Highlight ergeben sich aus den bisherigen Schlussfolgerungen weitere Forschungsfragen, die von Schülerinnen und Schülern selbsttätig oder mit Hilfe gefunden werden können und z.B. im Rahmen einer extracurricularen Förderung bei der Arbeit in einem Schülerlabor erforscht werden können. Das heißt mit anderen Worten: Genetisches Lernen wird durch forschendes Lernen ersetzt.

Es bleiben folgende Aufgaben offen, zu dessen Klärung die Autoren gerne ermuntern wollen:

a) Es sollte der Hypothese nachgegangen werden, dass auch Glucose mit einer anderen Abgangsgruppe als einem zweiten Monosaccharid an Position 4 unter Wöhlk-Bedingungen zur Rotfärbung führt.

b) Offen ist weiterhin, ob die Stereochemie der reduzierenden Zuckerkomponente des 1,4-verknüpften Disaccharids eine Rolle spielt.

Die zu erwartenden Ergebnisse sind kleine Puzzlesteine, die Mut zur Weiterarbeit an der Aufklärung des „Wöhlk-Reaktionsmechanismus“ machen sollen.

## 5 Literatur

- [1] Ruppertsberg, K. (2016), Dem Milchzucker auf der Spur – eine europäische Detektivgeschichte. *Praxis der Naturwissenschaften - Chemie in der Schule*, Band 65, Nr. 8, S. 30 - 33.
- [2] Ruppertsberg, K., Hain, J. (2016), Das Experiment: Wie kann der Lactosegehalt von Milchprodukten im Schulexperiment sichtbar gemacht werden? *CHEMKON - Chemie konkret*, Bd 23, Nr. 2, S.90-92, DOI 10.1002/ckon.201610272.
- [3] Ruppertsberg, K., Hain, J. (2016), Die Wiederentdeckung der Wöhlk-Probe. Der geheimnisvolle lachsrote Farbstoff. *Chemie in unserer Zeit*. S 106-111, DOI: 10.1002/ciuz.201600744.
- [4] Ruppertsberg, K. (2016), Stärkeverdauung durch Speichel - was kommt eigentlich dabei heraus? Ein einfacher Maltose-Nachweise am Ende der enzymatischen Hydrolyse von Amylose und die überraschende Anwesenheit von Glucose, *MNU-Journal* 69 (5) S. 325-328.
- [5] Wöhlk, A. (1904). Über eine neue Reaktion auf Milchzucker (und Maltose). *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **43** (11), S. 670-679.
- [6] Hough, L., Jones, J., Richards, E. (1953), *J. Chem. Soc.*, 2005-2009.
- [7] Umikoff, N. (1896). Zur differentiellen Reaction der Frauen- und Kuhmilch und über die Bestimmung der Lactationsdauer in der Frauenbrust. Aus dem chemischen Laboratorium des kaiserlichen Findelhauses in St. Petersburg, Leipzig, *Jahrbuch für Kinderheilkunde*, S.356-359.
- [8] Sieber, N. (1900). Ueber die Umikoff'sche Reaction in der Frauenmilch. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, Berlin, Band 30, Hefte 1 und 2, S. 101-106.
- [9] Fearon, W.R. (1942). The detection of lactose and maltose by means of methylamine, *The Analyst*, **67**, S.130-132.
- [10] Van Leent, F.H. (1894), *Einige Untersuchungen über Milchzucker, Galactose und Maltose und ihre Ammoniakverbindungen* (Dissertation an der Universität Basel), Verlag Mouton & Co., Haag.
- [11] Grob, P. (2000). *Einfache Schulversuche zur Lebensmittelchemie*, Aulis Verlag Deubner und Co KG, Köln, S.65-66.
- [12] <http://www.axel-schunk.de/experiment/edm1211.html> , zuletzt abgerufen am 1.6.2017
- [13] Fleiss, Ch. (2013). Kohlenhydrate im Unterricht. *Plus Lucis* 1-2/2013, S. 40-41.
- [14] <https://de.wikipedia.org/wiki/Lobry-de-Bruyn-Alberda-van-Ekenstein-Umlagerung> , zuletzt abgerufen am 1.6.2017.
- [15] Töpel, A. (2004). *Chemie und Physik der Milch*, Behr's Verlag, Hamburg.
- [16] Malpress, F. H., & Morrison, A. B. (1949). The semi-micro estimation of lactose alone and in the presence of other sugars. *Biochem. J.*, **45**(4), 455–459.
- [17] Gattermann, L., Wieland, T. (1982), *Die Praxis des organischen Chemikers*, S. 644, Berlin.

- [18] Angrick, M., Rewicki, D. (1980), Die Maillard-Reaktion. *Chemie in unserer Zeit*, 14: 149–157.  
doi:10.1002/ciuz.19800140503.
- [19] Hellwig, M., Henle, T. (2014), Backen, Altern, Diabetes: eine kurze Geschichte der Maillard-Reaktion. *Angew. Chem.* 126 (2014) 10482-10496.
- [20] Hollnagel, A., Kroh, L. (2002), 3-Deoxypentosulose: An  $\alpha$ -Dicarbonyl Compound Predominating in Nonenzymatic Browning of Oligosaccharides in Aqueous Solution. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 1659-1664.
- [21] Hollnagel, A., Kroh, L. (2000), Degradation of Oligosaccharides in Nonenzymatic Browning by Formation of  $\alpha$ -Dicarbonyl Compounds via a “Peeling Off” Mechanism. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 6219-6226.
- [22] Mavric, E., Henle, T. (2006), Isolation and identification of 3,4-dideoxypentosulose as specific degradation product of oligosaccharides with 1,4-glycosidic linkages. *Eur. Food Res. Technol.* 223: 803–810. DOI 10.1007/s00217-006-0273-5.
- [23] Hellwig, M., Henle, T. (2010), Formyllysine, a new glycation compound from the reaction of lysine and 3-deoxypentosone. *Eur. Food Res. Technol.* 230: 903–914.  
DOI 10.1007/s00217-010-1237-3.
- [24] Hellwig, M., Kiessling, M., Rother, S., Henle, T. (2016), Quantification of the glycation compound 6-(3-hydroxy-4-oxo-2-methyl-4(1*H*)-pyridin-1-yl)-l-norleucine (maltosine) in model systems and food samples. *Eur. Food Res. Technol.* 242:547–557.  
DOI 10.1007/s00217-015-2565-0.
- [25] Lomer, M. C. E., Parkes, G. C., Sanderson, J. D. (2008), Review article: lactose intolerance in clinical practice – myths and realities. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 27: 93–103.  
doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03557.x, S.99.

# Arbeitsblätter für den Unterricht

## Arbeitsblatt 1

### Versuch (Sek. I/II):

Was passiert, wenn man Milchprodukte sowie verschiedene Zucker mit Ammoniak reagieren lässt?

Zeitansatz: 45 Minuten, *alternativ ca. 75 Minuten bei zweistufigem Ablauf (siehe 1.4.1)*

#### 1.1: Gefahrenhinweise:

Ammoniaklösung („Salmiakgeist“),  $w(\text{NH}_3) = 10\%$ :   sollte nur im funktionierenden Abzug pipettiert werden! Schutzbrille! H314, H335.

Kalilauge ( $c(\text{KOH}) = 1 \text{ mol/L}$ ):   Schutzbrille tragen, H314, H302, H290

#### 1.2: Geräte und Chemikalien (es handelt sich um einen Vorschlag; je nach Verfügbarkeit können auch andere Gefäße und/oder Zucker eingesetzt werden):

Eine Heizplatte, ein 1000 mL-Becherglas mit 300 mL demin. Wasser, ein Thermometer, das bis 100 °C misst, Wasser, ein wasserfester Stift zum Beschriften, Einmalpipetten, 12 Reagenzgläser, ein Reagenzglasständer, eine Schutzbrille, ein Smartphone oder eine Kamera für die Fotodokumentation, Ammoniaklösung ( $w(\text{NH}_3) = 10\%$ ) („Salmiakgeist“), Kalilauge ( $c(\text{KOH}) = 1 \text{ mol/L}$ ), verschiedene möglichst naturbelassene Milchprodukte (ohne Glucose-Fructose-Sirup und ohne Farbstoffe; ggf. könnten Milchprodukte mit Farbstoffen durch das Einlegen entfetteter Wollfäden o.a. geeignetes Adsorbens entfärbt werden), zum Beispiel: 1) Kuhmilch, 2) lactosefreie Milch, 3) Kefir, 4) Buttermilch, 5) Crème fraîche (Sauerrahm), 6) Skyr (Frischkäse), 7) Kaffeesahne, sowie zum Vergleich jeweils 50 mg der folgenden Reinstoffe: 8) Lactose, 9) Glucose, 10) Galactose, 11) Saccharose und 12) Mischung von Glucose und Galactose.

#### 1.3: Aufbau:



**Abb. A1.1:** von links nach rechts: Ammoniaklösung, Kalilauge, Reagenzgläser Nr. 1-7: Milchprodukte gemäß Auflistung in 1.2, Nr. 8-12: Zuckerlösungen, Wasserbad 70 °C mit Thermometer.

#### 1.4: Durchführung:

In einem 1000 mL-Becherglas werden 300 mL Wasser auf 70 °C erhitzt und die Temperatur konstant gehalten (Kontrolle der Temperatur mit Thermometer, das idealerweise so an einem Stativ befestigt wird, dass es die Wassertemperatur misst und nicht die Bodentemperatur).

Von den unterschiedlichen Milchprodukten werden je 2 mL mit Einmalpipetten in nummerierte Reagenzgläser pipettiert. Je nach Viskosität der Milchprodukte müssen die Spitzen der Einwegpipetten etwas gekürzt werden.

In fünf weitere Reagenzgläser werden die oben genannten Zucker gegeben und jeweils in 2 mL Wasser gelöst.

Anschließend werden jeweils 2 mL Ammoniaklösung sowie 3 Tropfen Kalilauge hinzu pipettiert. Vorsichtig, aber gründlich schütteln, damit sich alles gut durchmischt!

Dann werden die Reagenzgläser in das heiße Wasserbad gestellt und für mindestens 15 Minuten dort belassen, bis die Farben der Proben sich gut entwickelt haben. Nach jeweils 5 Minuten erfolgt eine Sichtkontrolle mit Fotodokumentation mit der Smartphone-Kamera.



**Abb. A1.2:** Reaktionsprodukte der Referenzzucker, **Abb. A1.3:** Farbreifung der Milchprodukte.

**1.4.1 Didaktisch-methodischer Hinweis zur Durchführung:** Bei größerem Zeiteinsatz kann das Experiment auch in zwei Stufen durchgeführt werden: Erst werden die Zuckerlösungen getestet und die Ergebnisse protokolliert, dann werden im zweiten Schritt die Milchprodukte getestet; die Ergebnisse werden dann mit den Ergebnissen der Zuckerlösungen verglichen.

#### 1.5: Dokumentieren und protokollieren des Versuchsverlaufs:

Fertige während der Wartezeit eine Fotodokumentation des Versuchsverlaufs an (Smartphone-Kamera o.a.) und protokolliere, zu welchem Zeitpunkt welche Farbänderung zu beobachten ist!

## Arbeitsblatt 2: Chemiegeschichte (Sek. II)

**Aufgabe 2.1:** Bildet Arbeitsgruppen und bearbeitet die Texte in „Material zu Arbeitsblatt 2“ in den jeweiligen Kleingruppen.

**Aufgabe 2.2:** Berichtet euch gegenseitig und fasst zusammen: Welche(r) Forscher(in) hat welchen Forschungsbeitrag gegeben?

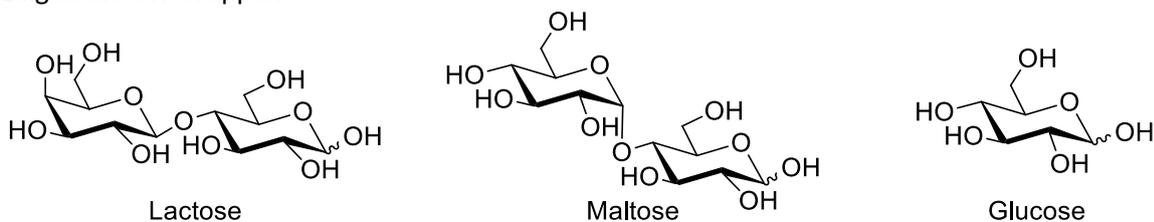
Jahr	Name, Ort	Forschungsbeitrag (in Stichworten)
1894	van Leent, Den Haag/ Basel	Rote Farbe bei Reaktion von Lactose und Ammoniak beobachtet
	Umikoff St. Petersburg	
	Marchetti,	
	Sieber/ Ziber-Shumova, St. Petersburg	
	Wöhlk,	
	Malfatti,	
1942	Fearon, Dublin	

**Aufgabe 2.3:** In welchen unterschiedlichen Fachbereichen arbeiteten die beteiligten Forscher?

Verbinde die Namen aus B) und folgende Fachbereiche durch farbige Linien zu: Biochemie, Kinderklinik, Urologie, Pharmazie, Organische Chemie, Lebensmittelchemie

**Aufgabe 2.4:** Warum bekamen die Findelkinder in St. Petersburg Ammenmilch und keine Fläschchen mit Milupa®- oder Alete®-Produkten?

**Aufgabe 2.5:** Vergleiche die Sesselkonfigurationen von Lactose, Maltose und Glucose (s.u.). Erläutere, was die Formeln gemeinsam haben und was sie unterscheidet. In welche Richtung (axial, äquatorial) zeigen die OH-Gruppen?



**Abb. A2.1:** Sesselkonfigurationen von Lactose, Maltose und Glucose.

## Material zur Arbeitsblatt 2:

### Frederik Hendrik van Leent (1894): Einige Untersuchungen über Milchzucker, Galactose und Maltose und ihre Ammoniakverbindungen

Der in Den Haag, Niederlande, geborene Frederik Hendrik van Leent (1866-1935) arbeitete an der Universität Amsterdam zusammen mit zwei Chemikern, die vor allem durch die Keto-Enol-Tautomerie von Zuckern im Alkalischen bekannt wurden, nämlich Cornelis Adriaan Lobry van Troostenburg de Bruyn und Willem Alberda van Ekenstein. Berücksichtigt man die tatsächliche Länge ihrer Namen, so kommt einem „Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerung“ noch gemäÙigt vor.

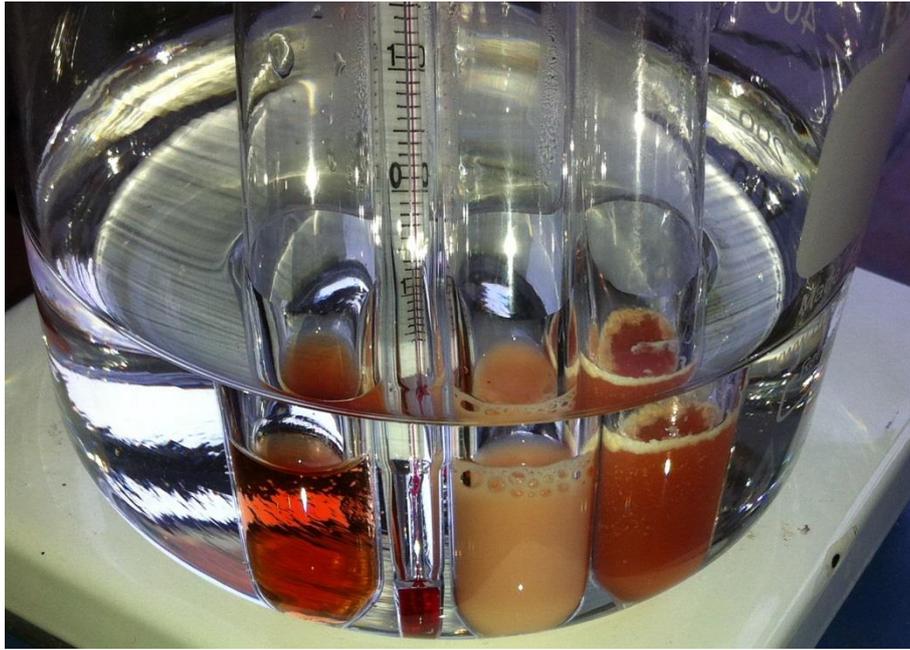
Seine Dissertation publizierte der Niederländer Frederik Hendrik van Leent im Jahre 1894 an der schweizerischen Universität Basel unter dem Titel „Einige Untersuchungen über Milchzucker, Galactose und Maltose und ihre Ammoniakverbindungen“; darin schreibt er über den Milchzucker: „In konzentriertem wässerigen Ammoniak geht die spezifische Drehung in fünf Tagen von 48,3° zu 30° hinab. Die Lösung aber färbt sich rot und allmählich braun.“ Leider geht van Leent im weiteren Text nicht mehr auf die Rotfärbung ein, und bezüglich der Braunfärbung bleibt zu sagen, dass Louis Camille Maillard seine Untersuchungen mit Zuckern und Aminosäuren erst 18 Jahre nach van Leent veröffentlichte.

### Umikoff (1896), Marchetti (1897) und Sieber (1900): Reaktionen von Milch mit Ammoniak und Aminen



**Abb. A2.2:** Nersess Sacharewitsch Umikoff, 1865-1956, Arzt im Labor des Kaiserlichen Findelhauses St. Petersburg, aus: Umikoff, N.S. in: <http://ru.hayazg.info/> Умиков Нерсес Захарьевич, zuletzt abgerufen am 27.2.2017.

Bereits 1896 hatte Prof. Nersess Umikoff (Abb. A2.1) im Labor des Kaiserlichen Findelhauses in St. Petersburg mit Ammoniak eine Art Qualitätskontrolle für die von Ammen angelieferte Muttermilch entwickelt. Dabei erfand er eine Methode, mit der man über den Lactosegehalt der Muttermilch abschätzen konnte, wie viele Wochen seit Beginn der Laktation vergangen waren: „Frauenmilch nimmt eine je nach dem Alter umso intensivere violetttröthliche Färbung an, während Kuhmilch gelb bis gelbbraun wird...“. Wie Abb. A2.2 zeigt, irrte Umikoff in diesem Punkt: Auch mit Kuhmilch ergibt sich eine Rotfärbung. Dieser Fehler wurde schon 1897 von einem in Florenz arbeitenden Wissenschaftler namens Marchetti (Vorname unbekannt) berichtigt: „Die (Umikoff'sche) Reaktion findet sich nicht ausschließlich bei der Frauenmilch, auch Kuhmilch giebt dieselbe bei zwanzig Minuten langer Erwärmung auf 70 °C. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Reaktion auf der Gegenwart von Milchzucker beruht“.



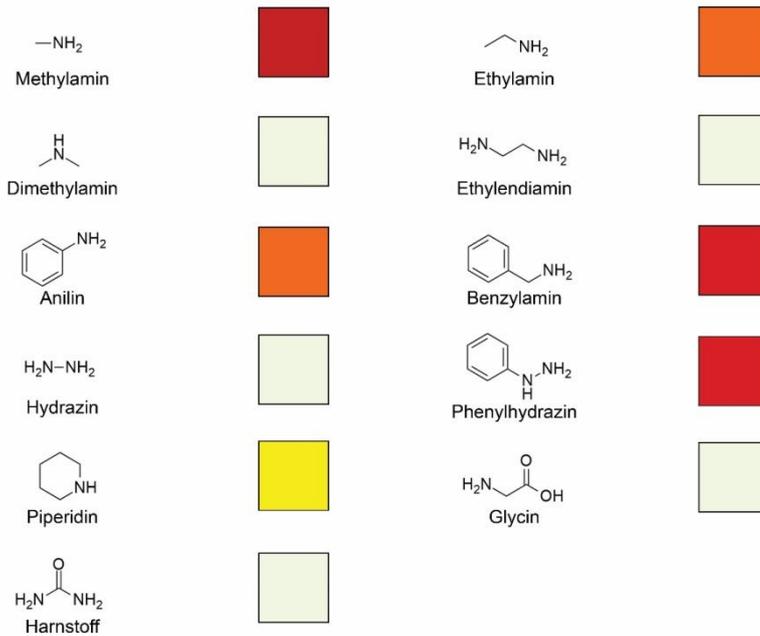
**Abb. A2.3:** 2,5%ige Lactoselösung (links), Kuhmilch (Mitte), Muttermilch (rechts) mit 10%iger Ammoniaklösung und 3 Tropfen 1 M KOH im 70 °C-Wasserbad.

Drei Jahre später arbeitete die in Samara geborene Nadeschda Olimpievna Ziber-Schumowa, die in Westeuropa als Nadine Sieber bekannt war, im Petersburger Nenski-Labor systematisch mit Muttermilch und verschiedenen Aminen. Dabei stellte sie unterschiedliche Farbreaktionen fest, die sich im Institut für Organische Chemie an der Universität zu Kiel wie in Abb. A2.3 nachvollziehen ließen. In Bezug auf den immer noch im Unklaren liegenden „Wöhlk-Mechanismus“ kann man aus diesen Versuchsergebnissen (die im Wesentlichen eine Bestätigung von sind) schon einmal schlussfolgern, dass zur Bildung des roten Farbstoffs außer Ammoniak auch primäre Amine geeignet sind, die einen elektronenliefernden Rest besitzen (Methylgruppe, Ethylgruppe, Benzylgruppe, ...)

Der Lebenslauf von Nadine Sieber alias Nadeshda Olimpievna Ziber-Shumova (**siehe Abb. A2.4**) ist auf der Homepage der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu finden. Wie sich beim genaueren Lesen herausstellt, handelt es sich um eine Pionierin unter den Wissenschaftlerinnen („First Ladies of the Lab“).



**Abb. A2.4:** Nadine Sieber alias Nadeshda Olimpievna Ziber-Shumova (Erläuterung siehe Text).



**Abb. A2.5:** Reaktion von Lactose mit verschiedenen Aminen und stickstoffhaltigen Verbindungen (aus Ruppertsberg/Hain 2017 mit freundlicher Genehmigung des Verlags).

#### Wöhlk 1904: Die Reaktion verschiedener Zucker mit Salmiakgeist

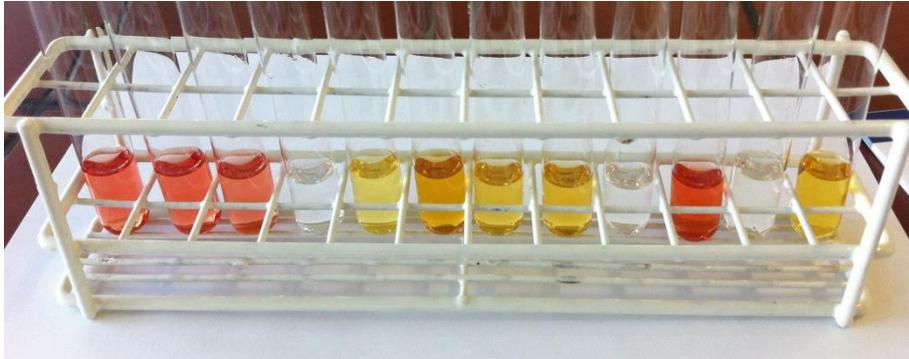
Im Jahr 1904 testete der dänische Apotheker und Pharmazeut Alfred Wöhlk verschiedene Zucker mit 10%iger Ammoniaklösung im heißen Wasserbad, offensichtlich ohne von Umikoff und Sieber zu wissen. Wie er selbst schreibt, hätte er den Versuch fast schon verworfen, wenn er nicht nach einer halben Stunde noch einmal zufällig auf die Reagenzgläser geschaut und zu seinem Erstaunen „eine prachtvolle, lebhaft rote Farbe“ entdeckt hätte. Wöhlk untersuchte daraufhin weitere Zucker sowie hydrolysierte Varianten (s. Abb. A2.6).

Wöhlk: Über eine neue Reaktion auf Milchzucker (und Maltose). 675

Kohlehydrat	Farbennuance nach Erhitzen im Dampfbad während 15–20 Minuten
Reine Glukose . . . . .	harngeb.
„ Maltose . . . . .	<b>krapprot.</b>
Hydrolysierte Maltose*) . . . . .	strohgeb.
Lösliche Stärke oder Amylodextrin . . . . .	beinahe farblos.
Hydrolysierte Stärke*) . . . . .	hellgeb.
Rohes Handelsdextrin . . . . .	braun.
Hydrolysiertes Handelsdextrin*) . . . . .	gelbbraun.
Reine Galaktose . . . . .	geb.
Reiner Milchzucker . . . . .	<b>krapprot.</b>
Hydrolysiertes Milchzucker . . . . .	hellgeb.
Reine Fruktose . . . . .	geb.
Hydrolysiertes Rohrzucker*) . . . . .	lebhaft geb.
Hydrolysierte Raffinose*) . . . . .	geb.
Reine Sorbinose . . . . .	hellgeb.
Reine Xylose . . . . .	strohgeb.
Reine Arabinose . . . . .	strohgeb.
Gummi arabicum . . . . .	farblos.
Hydrolysiertes Gummi arabicum*) . . . . .	geb.

**Abb. A2.6** aus Wöhlk 1904.

Auffällig ist, dass Wöhlk selbst die „prachtvolle rote Farbe“ als „krapprot“ bezeichnet. Krapp ein Farbstoff, der ursprünglich aus der Krapp-Pflanze (*Rubia tinctorium L.*) gewonnen wurde und seit 1869 durch das preisgünstigere Alizarin aus Steinkohleteer ersetzt wurde. Durch den Niedergang des Krapp-Anbaus ging das Wort im Sprachgebrauch nach und nach verloren.



**Abb. A2.7:** Ergebnis der Wöhlk-Malfatti-Probe von 1%igen Lösungen verschiedener Zucker, von links nach rechts: Lachsröt (RAL 3022) bei Lactose, Maltose, Lactulose und Cellobiose (von links: RG-Nr. 1, 2, 3, 10); andere Zucker ergeben Gelbtöne in verschiedenen Nuancen (hydrolysierte Saccharose, Fructose, Glucose, Galactose, Mischung von Glucose und Galactose, RG-Nr. 5, 6, 7, 8, 12) Die nicht reduzierenden Zucker Saccharose, Trehalose und Gentianose zeigen keine Färbung (RG-Nr. 4, 9, 11).

Die erste Wöhlk-Probe wurde wie folgt durchgeführt: „0,7 bis 0,5 g Milchzucker werden in einem schmalen Reagensglas in 10 cc 10-prozentigem Ammoniak gelöst. Dieses wird danach in ein Dampfbad oder in ein Wasserbad gestellt, das eben zu kochen aufgehört hat (...).“

#### **Malfatti 1905: Verbesserung der Wöhlk-Reaktion**

Wenige Monate nach der Publikation von Wöhlk meldet sich der Urologe Hans Malfatti aus Innsbruck mit einer kleinen, aber entscheidenden Verbesserung (siehe Abb. A2.7): Der Zusatz von fünf Tropfen 1-molarer Kalilauge verbessert und beschleunigt die Reaktion, die fortan in unzähligen Arzt- und Krankenhauslabors Anwendung findet, um z.B. eine Schwangerschaftsdiabetes von einer Lactosurie (Milchstau) zu unterscheiden. Die Zugabe von Kalilauge hat folgende Funktionen: Erstens braucht die Wöhlk-Reaktion streng alkalische Bedingungen ( $\text{pH} > 11!$ ) und kann durch sauren Urin oder darin vorhandene puffernde Substanzen (z.B. Phosphate) gefährdet werden, zweitens verkürzt sich dadurch auch der zeitliche Ablauf; dies ist für ein profitabel arbeitendes Labor von Wichtigkeit.

### **Über den Nachweis von Milchzucker im Harn.**

Von

**Dr. Hans Malfatti.**

Gar nicht selten tritt an den Harnanalytiker die Frage heran, ob eine reduzierende Substanz im Harn Milchzucker oder Traubenzucker sei, oder mit anderen Worten: ob sich im konkreten Falle im Verlaufe der Schwangerschaft Diabetes entwickelt habe, oder ob nur ein harmloser Fall von Laktosurie vorliegt. Im wohleingerichteten Laboratorium ist die Beantwortung dieser Frage gerade keine schwere Aufgabe; die Reindarstellung des Kohlehydrates, das Verhalten im Polarisationsapparat, die Nichtvergärbarkeit mit Apiculatus-Hefe, die Bildung charakteristischer Laktosazone und der Schleimsäure geben Anhaltspunkte genug. Aber schnell und leicht ausführbare und dabei doch zuverlässige klinische Reaktionen auf Milchzucker gibt es bis jetzt nicht. In der Praxis begnügte man sich gewöhnlich

**Abb. A2.8:** Faksimile Malfatti (Erläuterung siehe Text).

## Fearon 1942

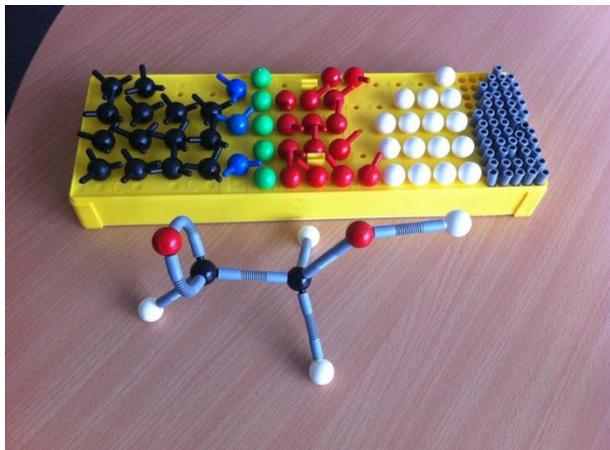
Eine verwandte Nachweisreaktion ist der Fearon-Test aus dem Jahr 1942 (benannt nach William Robert Fearon, 1882-1959, Universität Dublin), der sich in Irland, Großbritannien und USA großer Beliebtheit erfreute (s.u.); hier wird allerdings Methylamin anstelle von Ammoniak verwendet. Deswegen wird er auch in Lehrbüchern „Fearons Methylamine Test“ genannt. Bezüglich des Reaktionsmechanismus vertrat Fearon die Ansicht, dass Tests mit Ammoniumhydroxidlösungen „erratic and untrustworthy“ seien, da die Bildung des Farbstoffs wahrscheinlich davon abhängig sei, dass sich aus Ammoniak und Aldehyd erst ein Amin bilde, welches dann in einem zweiten Schritt mit dem Kohlenhydrat reagiere. Fearon hingegen setzt sofort ein primäres Amin ein (statt Methylamin probierte er auch Ethylamin und Hydroxyethylamin mit positivem Ergebnis).

### Literatur:

- Beyer, H., Walter, W. (1984), Lehrbuch der Organischen Chemie, Hirzel-Verlag Stuttgart, S.668.
- Curry, A. (2013). The milk revolution. *Nature* **500**, S. 20-22.
- Denisenko, T.V., Golikov, Y.P. (2013). Nadezhda O. Ziber-Shumova: the first Russian woman-Professor of biochemistry. *FEBS Journal* **280** (1), S. 618.
- Fearon, W.R. (1942). The detection of lactose and maltose by means of methylamine, *The Analyst*, **67**, S.130-132.
- Gefährdungsbeurteilung: [www.experimentas.de/experiments/view/1429](http://www.experimentas.de/experiments/view/1429) , zuletzt abgerufen am 28.6.2016.
- Höffeler, F. (2009) Geschichte und Evolution der Lactose(in)toleranz. *Biologie in unserer Zeit* **39**, S. 378-387
- Hough, L., Jones, J., Richards, E. (1953), *J. Chem. Soc.*, 2005-2009.
- Malfatti, H. (1905). Über den Nachweis von Milchzucker im Harne. *Centralblatt für die Krankheiten der Harn- und Sexualorgane*. Georg Thieme Verlag Leipzig, S.68-71.
- Marchetti (1897). Ueber den praktischen Werth der Umikoff'schen Reaktion und das Wesen derselben. In: Richard Maly's Jahresbericht über die Fortschritte der Thier Chemie, S. 266-267.
- Ochei, J., Kolhatkar, A. (2000). *Medical Laboratory Science*, Tata McGraw Publishing Company Ltd., New Delhi.
- Ruppersberg, K. (2016), Dem Milchzucker auf der Spur – eine europäische Detektivgeschichte. *Praxis der Naturwissenschaften - Chemie in der Schule*, Band 65, Nr. 8, S. 30 - 33.
- Ruppersberg, K. (2016), Stärkeverdauung durch Speichel - was kommt eigentlich dabei heraus? Ein einfacher Maltose-Nachweise am Ende der enzymatischen Hydrolyse von Amylose und die überraschende Anwesenheit von Glucose, *MNU-Journal* **69** (5) S. 325-328.
- Ruppersberg, K., Hain, J. (2016), Das Experiment: Wie kann der Lactosegehalt von Milchprodukten im Schulexperiment sichtbar gemacht werden? *CHEMKON - Chemie konkret*, Bd 23, Nr. 2, S.90-92, DOI [10.1002/ckon.201610272](https://doi.org/10.1002/ckon.201610272).
- Ruppersberg, K., Hain, J. (2016), Die Wiederentdeckung der Wöhlk-Probe. Der geheimnisvolle lachsrote Farbstoff. *Chemie in unserer Zeit*. S 106-111, DOI: [10.1002/ciuz.201600744](https://doi.org/10.1002/ciuz.201600744).
- Sieber, N. (1900). Ueber die Umikoff'sche Reaction in der Frauenmilch. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, Berlin, Band 30, Hefte 1 und 2, S. 101-106.
- Sieber, Nadine: <http://drw.saw-leipzig.de/31165> , letzter Zugriff am 1.6.2017.
- Siegfried GmbH (Hrsg.), (1962), *Das Labor des Arztes*, Säckingen, S.30.
- Struckmeier, S. (2003), *Naturfarbstoffe: Farben mit Geschichte*. *Chemie in unserer Zeit*, **37**: 402–409. doi:10.1002/ciuz.200300275.
- Umikoff, N. (1896). Zur differentiellen Reaction der Frauen- und Kuhmilch und über die Bestimmung der Lactationsdauer in der Frauenbrust. Aus dem chemischen Laboratorium des kaiserlichen Findelhauses in St. Petersburg, Leipzig, *Jahrbuch für Kinderheilkunde*, S.356-359.
- van Leent, F.H. (1894), *Einige Untersuchungen über Milchzucker, Galactose und Maltose und ihre Ammoniakverbindungen* (Dissertation an der Universität Basel), Verlag Mouton & Co., Haag.
- Wöhlk, A. (1904). Über eine neue Reaktion auf Milchzucker (und Maltose). *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **43** (11), S. 670-679.

### Arbeitsblatt 3: Stereochemischer Zugang zur Zuckerchemie (Sek. II)

**Aufgabe 3.1:** Arbeit mit dem Molekülbaukasten: Bildet eine Gruppe von idealerweise acht Personen und organisiert euch acht Molekülbaukästen (siehe Abbildung).



**Abb. A3.1:** Molekülbaukasten und Modell von Glykolaldehyd.

**Aufgabe 3.2:** Erstellung der acht D-Aldohexosen (Kettenform)

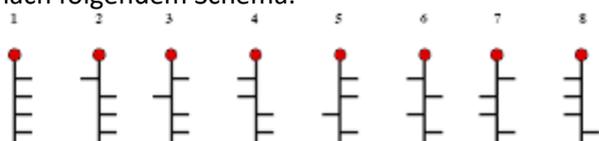
Sicherlich gibt es viele Möglichkeiten, die acht D-Aldohexosen als Molekülmodelle nachzubauen. Versucht es einmal mit dieser:

Zunächst baut jeder von euch das Modell von Glycolaldehyd (siehe Abbildung). Bei der Doppelbindung ist etwas Geschick erforderlich, die Bindungen müssen vorsichtig gebogen werden und dann erst wird das Sauerstoffatom eingepasst.

Dann trennt ihr die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung und baut vier weitere C-Atome dazwischen.

Die Kohlenstoffkette wird so ausgerichtet, dass ein C senkrecht unter dem anderen steht. Dabei entsteht eine Rundung, die nach hinten zeigen muss (Fischer-Projektion).

Nun wird die fehlenden Bindungen ergänzt: Zunächst erhält jedes C-Atom eine OH-Gruppe, und zwar nach folgendem Schema:



**Abb. A3.2:** Die acht D-Aldohexosen als Schema.

Die restlichen freien Bindungen werden mit Wasserstoffatomen abgesättigt.

Wenn ihr alles richtig gemacht habt, habt ihr nun die acht D-Aldohexosen in folgender Reihenfolge: Allose, Altrose, Glucose, Mannose, Gulose, Idose, Galactose, Talose.

Mathematiker unter euch werden sicherlich bemerkt haben, dass die Reihenfolge dem Dualsystem folgt: 0000, 0001, 0010, 0011, ...

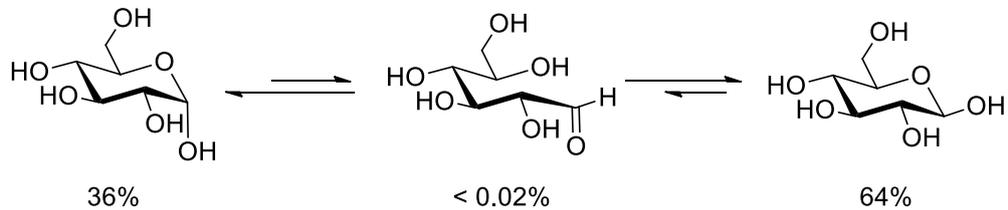
Die Namen der Aldohexosen kann man sich mit dem Merksatz „Alle alten Glucken möchten gern im Garten tanzen“ merken.

Die C-Atome werden nun neu nummeriert; das am höchsten oxidierte (Doppelbindung O) bekommt die Nummer 1.

(Zur Vollständigkeit: Für das fünfte C-Atom gibt es auch noch die Möglichkeit, dass die OH-Gruppe nach links zeigt. Dann ergeben sich die namentlich entsprechenden acht L-Zucker.)

**Aufgabe 3.3:** Bildung der Ringform (Halbacetal)

Drehe das kettenförmige Glucosemolekül nun so, dass sich die OH-Gruppe von C-5 an die Aldehydgruppe annähert. Bei der Addition an C-1 gibt es zwei Möglichkeiten: a) von oben, b) von unten. Durch den Wegfall der C=O-Doppelbindung ergibt sich ein neues Asymmetriezentrum, wodurch die beiden Anomeren  $\alpha$ -D-Glucose und  $\beta$ -D-Glucose entstehen.



**Abb. A3.3:** Die offenkettige Glucose-Formel (Mitte, kommt in neutraler wässriger Lösung zu 0,02% vor) geht zu 36% in die  $\alpha$ -D-Glucose (links mit OH-Gruppe in axialer Position) und zu 64% in  $\beta$ -D-Glucose (rechts mit OH-Gruppe in äquatorialer Position über (Mutarotation)).

**Aufgabe 3.4:** Dokumentiert eure Ergebnisse mit einem Smartphone, gestaltet mit den Ausdrucken der Fotos ein Poster und räumt bitte die Molekülbaukästen wieder ordentlich ein! ;-)

## Arbeitsblatt 4: Zuckerlabor (Sek. I)

### Mit welchen verschiedenen Zuckern haben wir es im Alltag zu tun?

Wenn du in deiner direkten Umgebung nach *chemisch verschiedenen* Zuckern (Würfelzucker und Zuckerhut sind chemisch identisch) suchst, wirst du schnell fündig: In der Zuckerdose findest du Rübenzucker, in Früchten und Süßigkeiten findest du Frucht- und Traubenzucker, in Milchprodukten findest du Milchzucker, und in Malzbonbons ist Malzzucker.

Ordne den deutschen Worten die Fachworte zu. Vervollständige dann den Rest der Tabelle mit Hilfe des Internets / Chemiebuchs:

Nr.	Deutsches Wort	Fachwort	Summenformel	Fünf-/Sechseckformel
1	T.....	Glucose (Dextrose)		
2	F.....	Fructose (Lävulose)		
3	R.....	Saccharose (Sucrose)		
4	.a.....	Maltose		
5	.i.....	Lactose		

### Überblick über die Systematik der Zucker

Wenn ein Wissensgebiet sehr umfangreich wird, dann ist es besonders wichtig, eine gute Systematik zu finden. Bestimmt hast du schon gemerkt, dass alle Zucker die Endung *-ose* haben. Je nachdem, wieviele Fünf- oder Sechsecke zusammen hängen, spricht man von Mono-, Di- oder Polysacchariden. Eine gute Übersicht findest du in

[https://de.wikibooks.org/wiki/Organische\\_Chemie\\_für\\_Schüler/\\_Kohlenhydrate](https://de.wikibooks.org/wiki/Organische_Chemie_für_Schüler/_Kohlenhydrate).

### Sammlung wichtiger Nachweisreaktionen:

Obwohl alle Zucker sehr viele Ähnlichkeiten miteinander haben, reagieren sie unterschiedlich. Dadurch kann man sie nachweisen und unterscheiden. Versuche, mit Hilfe des Chemiebuchs oder des Internets etwas über folgende Nachweisreaktionen herauszufinden!

Nr.	Name:	Nachweis für:	Literatur:
1	Urinteststreifen (Apotheke)		
2	Benedict-Reaktion		
3	Lugol'sche Lösung		
4	Wöhler-Probe		
5	Seliwanow-Probe		

Vielleicht kannst du in Absprache mit deiner Chemielehrkraft den einen oder anderen Test durchführen. Bitte achte auf Schutzkleidung (Labormantel) und das Tragen der Schutzbrille!

**Arbeitsblatt 5: Einführung in die Fotometrie (Sek. I/II)**  
**(In Anlehnung an eine Anleitung aus dem Agnes-Pockels-SchülerInnenlabor)**

Mit einem Fotometer kann man die Absorption von bestimmten Wellenlängen des Lichts messen. Wird das Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbiert, so wird die Komplementärfarbe sichtbar. In der folgenden Tabelle ist dieser Zusammenhang aufgeführt:

Absorbiertes Licht			Nach Absorption sichtbare Komplementärfarbe
Wellenlänge in nm	Energie in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	Farbe	
UV	> 297.5	-	-
400 - 440	297.5 - 270.5	violett	gelbgrün
440 - 480	270.5 - 246.9	blau	gelb
480 - 490	247.9 - 242.8	grünblau	orange
490 - 500	242.8 - 238.0	blaugrün	rot
500 - 560	238.0 - 212.5	grün	purpur
560 - 580	212.5 - 205.2	gelbgrün	violett
580 - 595	205.2 - 200.0	gelb	blau
595 - 605	200.0 - 196.7	orange	grünblau
605 - 800	196.7 - 148.8	rot	blaugrün
IR	> 148.8	-	-

**Chemikalien:**           **Farbige** Lösungen, z.B. Reagenzgläser 8-12 aus Arbeitsblatt 1

**Geräte:**                 Fotometer, Küvetten

**Info:**                    Informiere dich vor Versuchsbeginn beim **Assistenten** über die Handhabung eines **Fotometers**.

**Versuchsdurchführung:** *Miss jeweils das gesamte Spektrum von 400 - 600 nm in Abständen von 20 nm und notiere die Messwerte in der Tabelle (s.u.).*

**Messwerte:**

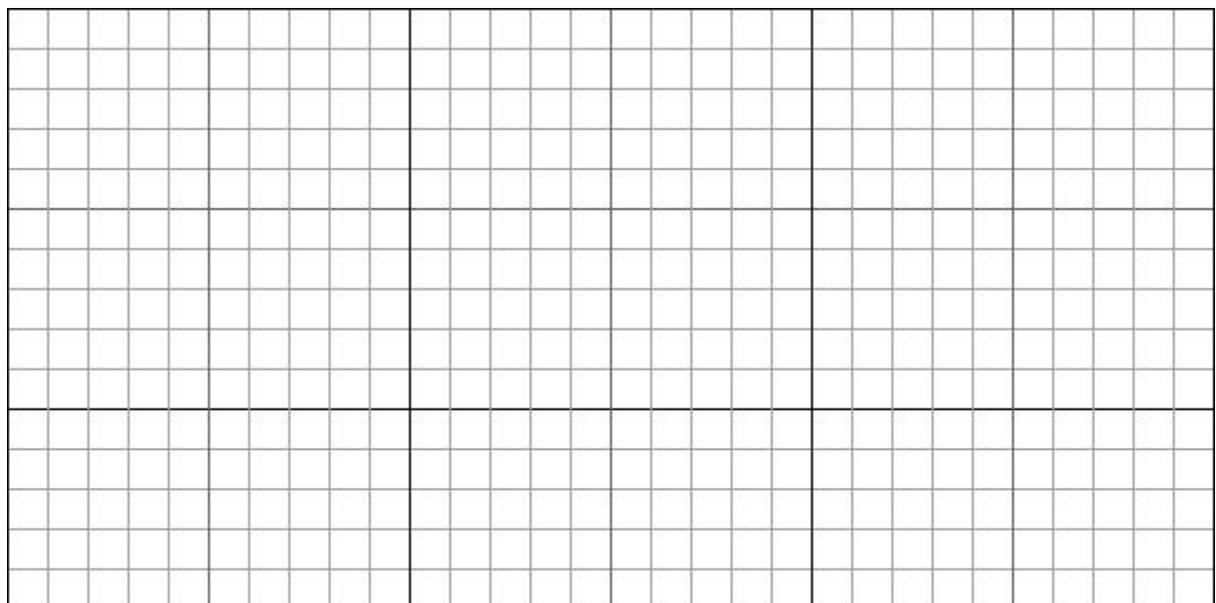
Substanz: \_\_\_\_\_

$\lambda$ [nm]										
A [%]										



**Auswertungsaufgaben:**

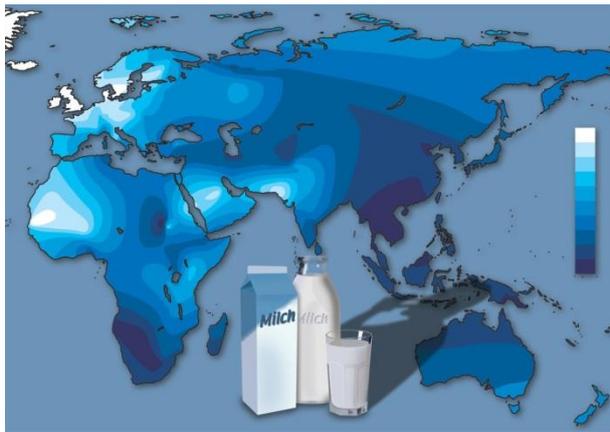
1. Erstelle mit deinen Messwerten einen Graphen (A vs.  $\lambda$ ) und deute den Kurvenverlauf!



## Arbeitsblatt 6: Warum können einige Menschen Milchzucker vertragen, andere hingegen nicht? (Sek. I/II)

**Aufgabe 6.1:** a) Finde anhand von Abbildung A6.1 heraus, an welchen vier geografischen Bereichen es Populationen gibt, in denen mehr als 90% der Menschen auch nach dem Kleinkindalter noch Lactose vertragen! b) Nicht abgebildet sind Nord- und Südamerika. Welche Verteilung würdest du hier erwarten und warum?

**Aufgabe 6.2:** a) Menschen, die nach dem Kleinkindalter noch Milch vertragen, nennt man lactasepersistent. Versuche, mit Hilfe einer Lehrkraft für Latein oder mit einem Nachschlagewerk herauszufinden, was das Fremdwort bedeutet! b) Warum ist lactasepersistente eine genauere Bezeichnung als lactoseintolerant?



**Abb. A6.1:** Prozentsatz erwachsener Menschen, die Milch vertragen können (aus: Höffeler, F.)

### Warum haben Menschen Milchwirtschaft betrieben, wenn gar nicht alle die Milch vertrugen?

Für die nach Norden ziehenden Jungsteinzeitmenschen war jede Nahrungsquelle wichtig. Im nordeuropäischen Winter gab es kaum Nahrungsmittel außer dem mitgeführten Milchvieh, das sich Heu ernähren konnte und eine vitaminreiche und nahrhafte Milch produzierte -also ein ganz klarer Vorteil für eine lactasepersistente Population! Zusätzlich haben sie einen Trick angewendet: sie haben die Milch so weiterverarbeitet, dass sie auch für den nicht-lactasepersistenten Bevölkerungsanteil verträglich wurde, z.B. in Form von Käse. Dass vor 7500 Jahren schon Käse in Mittel-Osteuropa hergestellt wurde, beweist der Fund eines neolithischen Käsesiebes auf einem Ausgrabungsfeld in Südostpolen, der zwar schon 1970 stattfand, aber erst im Jahre 2011 von der Geochemikerin Mélanie Roffet-Salque an der Universität Bristol ausgewertet wurde: Sie fand nämlich massenhaft Spuren von Milchfett auf der neolithischen Tonscherbe (Abb. A6.2)!



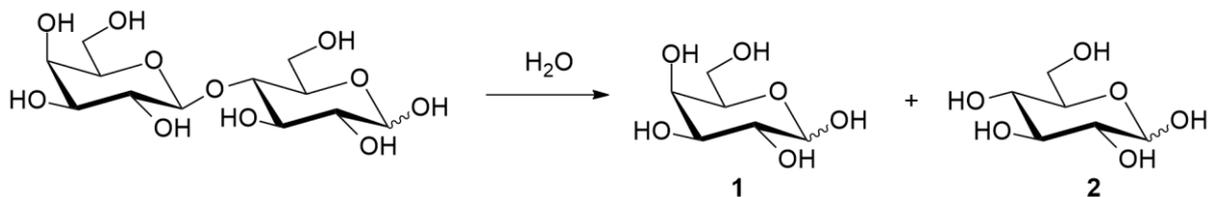
**Abb. A6.2:** Neolithische Tonscherbe, die Teil eines Käsesiebes war. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Mélanie Roffet-Salque, University of Bristol (Erläuterungen siehe Text).

**Aufgabe 6.3:** Vergleiche den Lactosegehalt dieser „klassischen“ Käsesorten und versuche, eine Regel aufzustellen, nach der man den Lactosegehalt vorhersagen kann!

Produkt	Lactosegehalt in g / 100 ml
Doppelrahmfrischkäse, 60% Fett	2,5
Emmentaler, 45% Fett	< 0,1
Frischkäse, Doppelrahm 60-85% Fett	2,6
Frischkäse, Rahm, 50% Fett	3,4
Mittelalter Gouda, 45%	< 0,1
Harzer Käse	< 0,1
Hüttenkäse	3,3
Kochkäse, 0-45% Fett	3,3-3,9
Parmesan	< 0,1
Schmelzkäse	2,8 – 6,5

Tabelle nach: <http://jucknix.de/laktosegehalt-von-kaeseprodukten/>

**Aufgabe 6.4:** Neuerdings gibt es auch lactosefreie Käsesorten, in denen aber Galactose auftaucht. Erkläre anhand des Reaktionsschemas in Abb. A6.3, warum Galactose auftaucht und warum das für Menschen mit Galactosämie gefährlich ist (<https://de.wikipedia.org/wiki/Galaktosämie>).



**Abb. A6.3:** Hydrolytische Spaltung von Lactose (links) in Galactose (Mitte) und Glucose (rechts).

**Literatur:**

Curry, A. (2012): The milk revolution. In: Nature 500, S. 20-22, 2013; Karte: Leonardi, M. et al.: The evolution of lactase persistence in Europe. In: International Dairy Journal 22, S. 88-97.

Höffeler, F. (2009), Geschichte und Evolution der Lactose(in)toleranz. Das Erbe der frühen Viehzüchter. Biologie in unserer Zeit, 39: 378–387. DOI:10.1002/biuz.200910405.

Lomer, M. C. E., Parkes, G. C., Sanderson, J. D. (2008), Review article: lactose intolerance in clinical practice – myths and realities. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 27: 93–103. DOI:10.1111/j.1365-2036.2007.03557.x, S.99.

Salque, M., Bogucki, P. I., Pyzel, J., Sobkowiak-Tabaka, I., Grygiel, R., Szmyt, M., Evershed, R. P.: Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe. In: Nature, 2012. DOI: 10.1038/nature11698.