

Enzymatischer Eiweiß-Verdau



I. Materialzusammenstellung

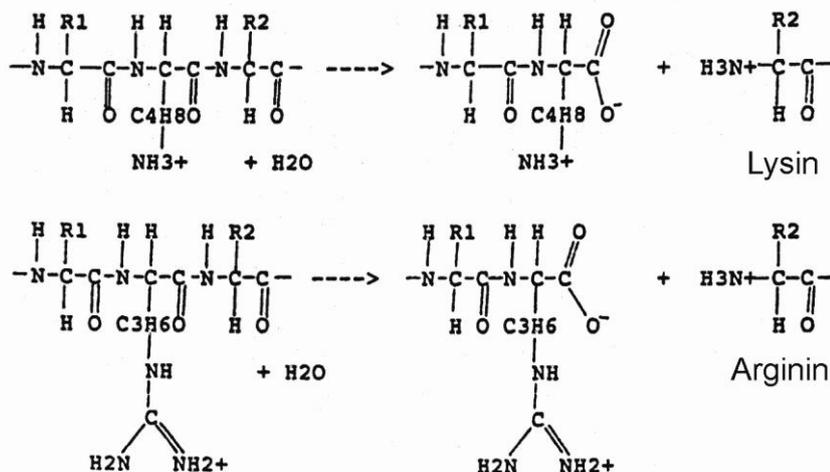
Die folgende Auflistung ermöglicht Ihnen die Vollständigkeit des erhaltenen Materials zu überprüfen oder zu kontrollieren, ob die Materialien, die Sie schon besitzen, komplett sind.

- lösliche Rinderalbumine (10 g)
- Pankreatin (Pulver) (5 g)
- Biuret-reagenz (100 ml)
- Ninhydrin-Reagenz (100 ml)
- Pufferlösung (1 Liter)
- 1 Packung Zellophanpapier

II. Versuchsprinzip

Pankreatin (aus dem Pankreas entnommen) enthält ein Enzym, das für die Eiweißhydrolyse aus Polypeptiden und Aminosäuren zuständig ist: Trypsin.

Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von Eiweißverbindungen an den Stellen, wo auf Carbonylgruppen Lysin oder Arginin folgt.



Dieses Versuchs-Kit "Eiweißverdauung" ermöglicht die Bearbeitung von Albuminen durch das Enzym Pankreatin (Trypsin) in wässriger Lösung bei 40°C und einem pH-Wert von 8,3.

Zwei Vergleichsproben V1 und V2 (entsprechend dem Reaktionsmilieu ohne das Enzymsubstrat, ohne das Enzym) werden unter gleichen physiochemischen Bedingungen betrachtet.

Die Hydrolyse von Albuminen durch Pankreatin wird durch das Verschwinden der Ausflockung gezeigt.

Die Darstellung dieser molekularen Aufspaltung erfolgt mittels Dialyse an einer Zellophanmembran (für Wasser und kleine Moleküle durchlässig, nicht permeabel für große Moleküle wie Proteine).

Destilliertes Wasser wird in eine Petrischale gegeben und von einer Zellophanmembran bedeckt. Das Hydrolyse-Produkt wird auf die Zellophanmembran gegeben. Die Aminosäuren (durch Hydrolyse der Proteine) passieren die Membran und befinden sich nun im unteren Teil der Petrischale (unterhalb der Membran). Ihr Vorkommen wird durch einen Ninhydrin-Test nachgewiesen.

Die zwei Vergleichsproben V1 und V2 werden gleichermaßen bearbeitet.

III. Materialien und notwendiges Zubehör

- Petrischalen
- Reagenzgläser 16 x 160 mm
- Wasserbad (37°C)
- Wasserbad (kochend)
- Halterung für Reagenzgläser
- Pipetten (5 ml)
- konzentrierte Essigsäure
- Chloroform
- destilliertes Wasser

IV. Praktische Arbeit

a) Hydrolyse von Ovalbuminen (aus Eiklar) durch Trypsin

- Vorbereitung des Substrats: 0,2 g Ovalbumine in 20 ml Wasser lösen (warm) bis zur Ausflockung.
- Vorbereitung des Enzyms: 0,1 g Pankreatin in 5 ml Wasser lösen, stark schütteln.
- Aufteilen in 3 Reagenzgläser:

	Reagenzglas A	Reagenzglas T2	Reagenzglas T2
Ovalbumine	3 ml	3 ml	0 ml
Enzyme	1 ml	0 ml	1 ml
Pufferlösung	3 ml	3 ml	3 ml
Wasser	0 ml	1 ml	3 ml

Die 3 Reagenzgläser werden in ein Wasserbad (40°C) gestellt. Nach 1 bis 2 Stunden verschwindet die Ausflockung in Reagenzglas A. In den Reagenzgläsern V1 und V2 kann keine Veränderung beobachtet werden. Die Hydrolyse der Ovalbumine unter Anwesenheit von Trypsin hat stattgefunden.

b) Darstellung der molekularen Zerlegung durch Dialyse

- Vorbereitung dreier Petrischalen (unteres Abteil) wie vorher die Reagenzgläser: A, V1, V2.
- Abdecken mit Zellophanpapier, mit einem Gummiband fixieren.
- Der Inhalt der passenden Reagenzgläser wird in die entsprechenden Petrischalen (A, V1, V2) gegeben und einige Stunden dialysiert (idealerweise über Nacht).
- Probenentnahmen aus jeder Petrischale, nachdem die Abwesenheit von Proteinen (negativer Biuret-Test) und die Anwesenheit von Aminosäuren (positiver Ninhydrin-Test) nur in A nachgewiesen wurden.

Biuret-Test

ermöglicht den Nachweis von Proteinen oder Peptiden in einer Lösung. In ein Reagenzglas werden 1 ml (zu analysierende) Lösung (Albumin-Lösung) und 2 ml Biuretreakanz gegeben. Der Indikator wechselt von einer türkis-blauen Färbung zu einem intensiven Blau bei Anwesenheit von Proteinen.

Ninhydrin-Test

ermöglicht Aminosäuren in einer Lösung nachzuweisen. In ein Reagenzglas werden 3 ml der zu analysierenden Lösung und 1 ml Ninhydrin-Reagenz gegeben. 3 min in einem kochenden Wasserbad erhitzen. Hinzufügen eines Tropfens konzentrierter Essigsäure und 1 ml Chloroforms. Stark schütteln. Eine Orangefärbung zeigt das Vorkommen von Aminosäuren in der Lösung an.

c) Ergebnisse

Die **Biuretreaktion** ist für alle 3 Dialysate negativ, da die großen Moleküle (Peptide, Protide, Proteine) die Zellophanmembran nicht passieren können.

Die **Ninhydrinreaktion** ist für das Dialysat A positiv, für die Vergleichsdialysate V1 und V2 jedoch negativ. Aminosäuren, die Resultate der Proteinhydrolyse durch das Enzym sind, sind kleine Moleküle, die die Zellophanmembran passieren können und so auch in den anderen Bereich (unterer Teil der Petrischale) gelangen können. Es haben also molekulare Aufspaltungen stattgefunden.

