

## Enzymatischer Kohlenhydrat-Verdau



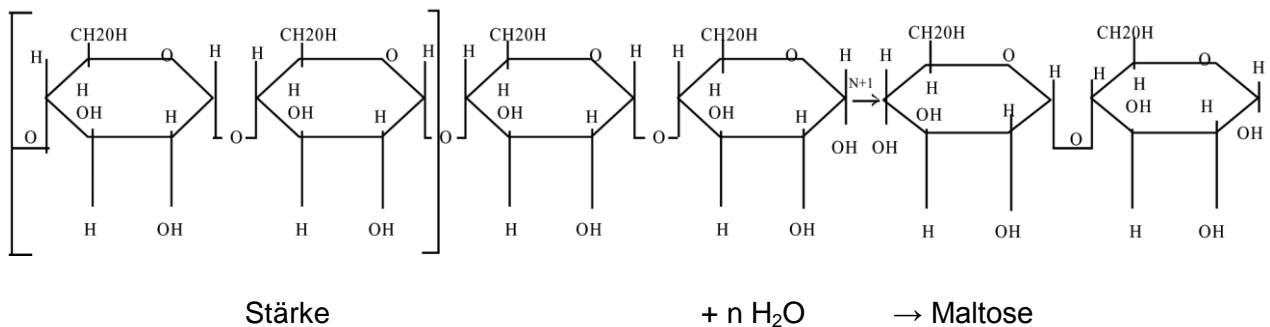
### 1. Materialzusammenstellung

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 Stärke
- Jodhaltiges Wasser /Jod-Wasser-Lösung (oder Lugol'sche Lösung)
- Fehlingreagenz
- Phenylhydrazin
- Materialien für Dialyse: Cellophanpapier (1 Pack)
- Pufferlösung
- Essigsäure

### 2. Prinzip

Die Speichelamylase katalysiert den Abbau von Stärke zu Maltose



Jod-Wasser (rot-braun gefärbt) nimmt bei Anwesenheit von Stärke eine blau-violette Farbe an (Einlagerung von Jod in das schraubenförmige Stärkemolekül); diese Farbgebung verschwindet bei der Stärkehydrolyse.

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird bei 37 °C und einem nahezu neutralen pH-Wert erreicht.

*Die molekulare Aufspaltung wird durch Dialyse nachgewiesen:*

Eine für Wasser und kleine Moleküle permeable Membran trennt einen mit destilliertem Wasser gefüllten Bereich von einer Stärkelösung, der Enzyme zugegeben werden. Die Stärke wird zu Maltose abgebaut, welche aufgrund ihrer geringeren Größe die Zellophanmembran passieren kann; ein Nachweis der Maltose beiderseits der Membran erfolgt durch Fehlingreagenz.

*Maltose wird mittels Phenylhydrazin nachgewiesen:*

Dieses Reagenz ermöglicht die Bildung von Osazon-Kristallen, die im Mikroskop betrachtet und aufgrund ihrer charakteristischen Form (der reduzierte Zucker in Verbindung mit Phenylhydrazin) nachgewiesen werden können.

### 3. Notwendiges Zubehör

- Reagenzgläser aus Borosilikatglas 16 x 160 mm (z.B. [102.3031](#))
- Halterung für Reagenzgläser/ Reagenzglasständer (z.B. [200.0054](#))
- Pipette (5 ml) (z.B. [200.6715](#))
- Wasserbad (37°C)
- Wasserbad (kochend)

### 4. Arbeitsweise und Ergebnisse

#### a) Wirkweise der Amylase

- Herstellung einer Stärkelösung durch Lösen von 1g Stärkepulver in 100 ml kochendem destilliertem Wasser. 10 Minuten kochen. Filtrieren.
- Aufteilen in 12 Reagenzgläser: je 2 ml Stärkelösung, 2 ml Pufferlösung
- Zugabe von 0,5 ml Speichel in 6 Reagenzgläser, 0,5 ml destilliertes Wasser in die 6 anderen Reagenzgläser (Nullabgleich/ Referenz). Mischen.
- Die Reagenzgläser werden in das Wasserbad (37 °C) gestellt und der Zeitpunkt t = 0 notiert.

Entnahme eines Reagenzglases mit Enzym und eines Reagenzglases ohne Enzym zwecks Abgleich zum Zeitpunkt t = 5 min. Zugabe eines Tropfens Lugol'scher Lösung. Schütteln. Die Lösung im Vergleichsröhrchen weist eine intensive Blaufärbung auf, während die Enzym-Lösung klarer bleibt.

Wiederholtes Durchführen der gleichen Arbeitsschritte zu den Zeiten  $t = 10 \text{ min}$ ,  $15 \text{ min}$ ,  $20 \text{ min}$ , und  $25 \text{ min}$ . Die Lösungen in den Vergleichs-Röhrchen weisen immer eine intensive Blaufärbung auf, bei den Speichel enthaltenden Lösungen schwächt sich die auf das Jod-Wasser zurückzuführende Verfärbung mit der Zeit immer weiter ab und verschwindet (je nach Enzymkonzentration im Speichel) schließlich vollständig.

Wenn bereits bei der ersten Probe keine Verfärbung zu beobachten ist, sollte nach jeder Minute eine Probenentnahme stattfinden.

Wenn die Lösung jedoch auch nach  $25 \text{ min}$  noch Verfärbungen aufweist, sollte die Enzymmenge verdoppelt werden und die Zeiten zwischen den Probeentnahmen eventuell verlängert werden.

### **b) Vergleich mit der Säurekatalyse bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$**

- 50 ml Stärkelösung (Herstellung siehe 4a) werden in einen Erlenmeyer-Kolben gefüllt
- Hinzufügen von ca. 5 ml konzentrierter HCl
- Erlenmyer-Kolben in ein Wasserbad (kochend) geben
- Probenentnahmen in Zeitintervallen von je 5 min, jeweils Zugabe von Jod-Wasser

Nach etwa 5 - 10 min entstehen Dextrine (Produkte des Stärkeverfalls mit Molekülgrößen zwischen Stärke und Glucose). Je nach Zerlegungsgrad der Dextrine zu Glucose, ergeben sich bei Zusatz von Jod-Wasser Verfärbungen von blau über violett und rot zu farblos.

### **c) Wirkungsbedingungen der Amylase (Milieu- bzw. Temperaturabhängigkeit der Enzymfunktion)**

Vorbereitung von 12 Reagenzgläsern, die die folgenden Versuche ermöglichen:

- Wirkung des pH-Werts auf die Enzymaktivität
- Wirkung der Temperatur auf das Enzym und die Enzymaktivität

#### **1) Abhängigkeit vom pH-Wert**

In ein Reagenzglas werden gegeben:

- 2 ml Stärkelösung
- 2 ml destilliertes Wasser
- einige Tropfen konzentrierte HCl

In ein Reagenzglas zum Abgleich:

- 2 ml Stärkelösung
- 2 ml Pufferlösung

Hinzufügen von 0,5 ml Speichel in jedes Reagenzglas. Der Zeitpunkt  $t = 0$  wird notiert und die Reagenzgläser in ein Wasserbad (37 °C) gestellt. Durchführen des Stärkenachweises mit Jod-Wasser in beiden Proben nach der für die Stärkeumwandlung im Probenreagenzglas notwendigen Zeit (siehe 4 a). Im Gegensatz zum Abgleich erscheint im sauren Milieu eine Blaufärbung, auch wenn man den Versuch auf mehrere Stunden ausdehnt. Die Speichelamylase arbeitet also nicht im sauren Milieu.

## **2) Abhängigkeit von der Temperatur**

1. Vorbereiten zweier Reagenzgläser:

- 2 ml Stärkerlösung
- 2 ml Pufferlösung

Hinzufügen von 0,5 ml Speichel in eine Probe zum Abgleich und von 0,5 ml Speichel, der zuvor auf 80 °C erhitzt wurde, in das andere Reagenzglas. Überführen in ein Wasserbad (37 °C). Der Test mit Jod-Wasser ergibt, dass die auf 80 °C erhitzte Amylase keine Stärke mehr hydrolysiert, auch wenn man sie mehrere Stunden wirken lässt.

2. Vorbereiten einer Vergleichsprobe.

- 2 ml Stärkelösung
- 2 ml Pufferlösung
- 0,5 ml Speichel

Zwei weitere Reagenzgläser, die die gleiche Lösung wie die Vergleichsprobe enthalten werden in einem Eisbad gefroren/ tiefgekühlt. Die Vergleichsprobe wird in ein Wasserbad (37 °C) gestellt, die anderen zwei Reagenzgläser bleiben in dem Eisbad.

Während die Vergleichsprobe eine negative Reaktion auf Jod-Wasser zeigt (Verschwinden der Stärke), zeigt der Test bei einer der tiefgefrorenen Proben eine positive Reaktion (Blaufärbung), da die Stärke nicht hydrolysiert werden konnte. Die andere tiefgefrorene Probe wird in ein Wasserbad (37 °C) gestellt. Nach Verstreichen der Zeit gemäß Angabe in 4 a), kann mittels der Lugolschen Lösung keine Blaufärbung (also keine Stärke) nachgewiesen werden.

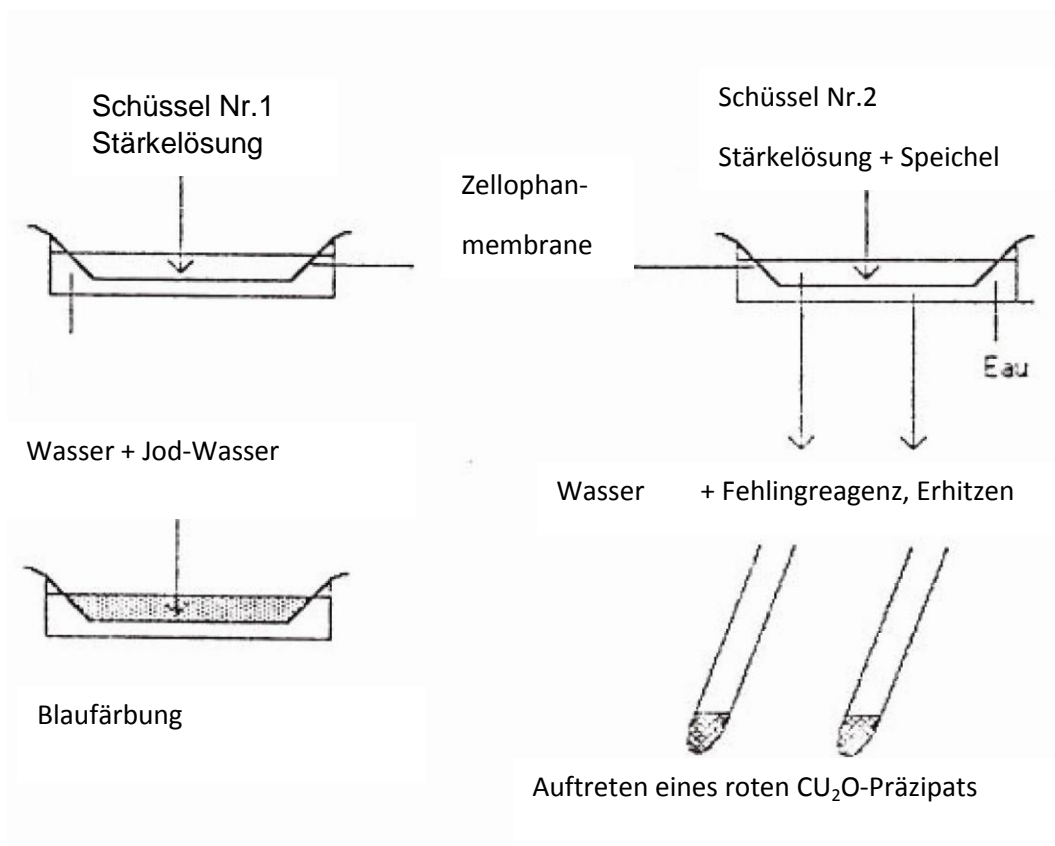
Folglich wird die Speichelamylase durch Kälte nicht zerstört.

Amylase kann auch bei 0 °C aktiv sein. Da die Reaktionsgeschwindigkeit dann jedoch so gering ist, benötigt die Reaktion mehrere Stunden.

## **d) Nachweis der molekularen Aufspaltung**

- Zwei runde Plastikschüsseln werden nummeriert und bis zur Hälfte mit Wasser gefüllt.
- Hinzufügen von 2 ml Jod-Wasser in Schüssel Nr. 1, zu einer homogenen Lösung vermischen.
- Bedecken der zwei Schüsseln mit Zellophanpapier, welches vorher auf beiden Seiten mit einem feuchten Schwamm abgerieben wurde.
- Vorbereiten einer Stärkelösung: 5 g Stärke werden einige Minuten in 50 ml destilliertem Wasser gekocht.

- Befüllen eines Reagenzglases mit 2,5 ml dieser Lösung und 2,5 ml Pufferlösung.
- Hinzufügen von 0,5 ml Speichel, schütteln und Überführung in ein Wasserbad (37 °C) für 30 min. Von Zeit zu Zeit schütteln.
- Übertragen des Reagenzglasinhaltes auf das Zellophanpapier der Schüssel Nr. 2 und von 5 ml Stärkelösung mit ½ Pufferlösung verdünnt auf das Zellophanpapier der Schüssel Nr.1.
- Es muss sichergestellt werden, dass ein Kontakt zwischen Zellophanpapier und den Flüssigkeiten besteht. Über Nacht stehen lassen.
- In der Schüssel Nr. 1 erscheint eine Blaufärbung im oberen Teil, der untere Teil behält die gelbe Farbe des Jod-Wassers bei.
- In der Schüssel Nr. 2 ist die Reaktion des Jod-Wassers im oberen Teil negativ. Proben beider Teile (oberhalb und unterhalb der Membran) wird Fehlingreagenz zugegeben (wenige Milliliter der Lösung werden mit 1 - 2 ml Fehlingreagenz zum Kochen gebracht). Ein rotes Reaktionsprodukt (Präzipitat) entsteht, welches die Anwesenheit eines reduzierten Zuckers anzeigt. Maltose, die durch die Elektrolyse von Stärke (katalysiert durch die Amylase) entstanden ist, ist ein kleines Molekül, welches die Zellophanmembran passieren kann.



**e) Bestimmung des gebildeten Produkts**

Vorbereiten des Phenylhydrazin-Reagenz: 1 ml Phenylhydrazin und 1 ml konzentrierte Essigsäure (80 % oder kristallisiert) werden in ein Reagenzglas gegeben. Schütteln. Hinzufügen von 10 ml destilliertem Wasser. Stark schütteln.

- Vorbereiten einer Stärkelösung: 2 g Stärke werden einige Minuten in 20 ml destilliertem Wasser gekocht.
- Abfüllen von 2,5 ml der Lösung und 2 ml Pufferlösung in ein Reagenzglas.
- Hinzufügen von 0,5 ml Speichel, schütteln und Überführung in ein Wasserbad (37°C) für mindestens 30 min.

Eine Gelbfärbung erscheint im Laufe der Reaktion, nach Abkühlung können Maltosazone nachgewiesen werden. Diese Kristalle bestehen aus kurzen konzentrischen Lamellen und Rosetten formenden Ausfällungen.

Diese Kristalle sind für Maltosazone charakteristisch. Sie können unter dem Mikroskop zwischen Objektträger und Deckglas betrachtet werden (Vergrößerung 400x).