

Saure und enzymatische Hydrolyse der Stärke (V 9)

Saure und enzymatische Hydrolyse der Stärke

In der Zusammensetzung der menschlichen Nahrung nehmen die Kohlenhydrate den ersten Rang ein. Das wichtigste Kohlenhydrat ist dabei die Stärke. Stärke besteht aus zwei Komponenten der Amylose und dem Amylopektin. Abhängig von ihrer Herkunft sind die Anteile der beiden Komponenten unterschiedlich. Bei beiden Verbindungen handelt es sich um Makromoleküle mit dem monomeren Bestandteil Glucose. In der Amylose sind die Glucoseeinheiten α -1,4-glykosidisch verknüpft. Im Amylopektin sind zusätzlich α -1,6-glykosidisch verknüpfte Glucosemoleküle enthalten. Amylopektin ist also im Gegensatz zu Amylose verzweigt. Bei der Verdauung der Stärke durch das Enzym α -Amylase, einer Endohydrolase, werden α -1,4-glykosidische Bindungen im Inneren der beiden Homoglykane gespalten. Zwischenzeitlich entstehen sogenannte Dextrine, die dann weiter hauptsächlich zu Maltose und Isomaltose umgesetzt werden. Daneben werden geringe Mengen an Grenzdextrinen und Glucose gebildet.

Im vorliegenden Versuch soll zum einen eine Gesamthydrolyse der Stärke durchgeführt werden. Glykosidische Bindungen sind säurelabil. Durch Inkubation mit Salzsäure bei höherer Temperatur werden die glykosidischen Bindungen gespalten. In einem weiteren Versuchsteil soll die enzymatische Spaltung mit α -Amylase des Speichels untersucht werden. Der Fortgang der Spaltungen wird durch das Auftreten von reduzierenden Gruppen verfolgt. Dazu werden Glucose bzw. die endständigen reduzierenden Glucosereste mit 3,5-Dinitrosalicylat nachgewiesen.

1. Saure Hydrolyse

a) Material und Reagenzien

Stärkelösung 8 mg/mL
Salzsäure 2 mol/L
Natronlauge 2 mol/L
3,5-Dinitrosalicylat-Reagenz

b) Durchführung

Es werden 10 Schraubdeckelgefäße durchnummeriert und nach folgendem Schema befüllt:

Glas Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Wasser	0,4 mL									
Stärke		0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL
NaOH bei t=0	1 mL	1 mL								
HCl	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL

Gläser Nr. 3-10 werden in ein kochendes Wasserbad gestellt, nach folgendem Zeitplan wieder entnommen

T (min.)			3 min.	6 min.	9 min.	15 min.	20 min.	30 min.	45 min.	60 min.
----------	--	--	--------	--------	--------	---------	---------	---------	---------	---------

und zum Abstoppen der Reaktion dann sofort mit 1 mL NaOH versetzt.

Zum Nachweis der Spaltung pipettiert man in jedes Schraubdeckelgefäß 1 mL Dinitrosalicylat-Reagenz und erhitzt alle Proben 5 min. im kochenden Wasserbad. Nach dem Abkühlen werden die Lösungen mit 17 mL Wasser verdünnt, gemischt und die Extinktion bei 546 nm gegen den Blindwert gemessen.

2. Enzymatische Hydrolyse

a) Material und Reagenzien

Siehe unter 1.
Zusätzlich:
Phosphatpuffer pH 6,9
Speichel

Unmittelbar vor dem Versuch wird ungefähr 1 mL Speichel gesammelt. Wenn die Versuchsreihe vorbereitet ist, wird der Speichel ca. 1:80 mit Phosphatpuffer pH 6,9 verdünnt (0,1 mL Speichel + 7,9 mL Puffer).

Es werden 10 Schraubdeckelgefäße durchnummeriert und nach folgendem Schema befüllt:

Glas Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Wasser	0,4 mL									
Stärke		0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL
Dinitrosalicylat	1 mL	1 mL								
Speichel (verd.)	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL

Der Inhalt aller Gläser wird gut gemischt und bei Zimmertemperatur entsprechend dem folgendem Schema inkubiert:

T (min.)			3 min.	6 min.	9 min.	15 min.	20 min.	30 min.	45 min.	60 min.

Die Reaktion wird nach der Inkubation bei den Gläsern 3 – 10 mit 1 mL Dinitrosalicylat-Reagenz gestoppt.

Danach werden alle Proben 5 min im kochenden Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen werden sie mit 18 mL Wasser verdünnt, gemischt und die Extinktion bei 546 nm gegen den Blindwert gemessen.

3. Glucoseeichkurve

a) Material und Reagenzien

Glucoseeichlösung: 5 mg/mL (M_D-Glucose-Monohydrat: 198,17), Dinitrosalicylat-Reagenz (siehe 1.)

b) Durchführung

In 6 Reagenzgläser werden Glucoselösung und Wasser nach folgendem Schema pipettiert:

Glas Nr.	1	2	3	4	5	6
Glucose [mL]	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
H ₂ O [mL]	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,0
Dinitrosalicylat-reagenz [mL]	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Danach werden alle Proben 5 min im kochenden Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen werden sie mit 18 mL Wasser verdünnt, gemischt und die Extinktion bei 546 nm gegen den Blindwert (Glas Nr. 1) gemessen.

b) Auswertung

Glucose-Eichkurve:

Tragen Sie auf Millimeterpapier die gemessenen Extinktionen (Y-Achse) gegen die millimolaren Glucosekonzentrationen (X-Achse) auf.

Saure Hydrolyse:

Tragen Sie die Extinktionen (Y-Achse) gegen die Zeit (X-Achse) auf. Die Kurve zeigt ein Plateau. Entnehmen Sie dort die Werte mit der höchsten Extinktion (evtl. Mittelwert). Über die Eichkurve bestimmen Sie die bei der Hydrolyse gebildete Menge Glucose.

Enzymatische Hydrolyse:

Tragen Sie die Extinktion gegen die Zeit in das obige Schaubild ein.

Bestimmung des Polymerisationsgrades:

Ein Maß für die Anzahl der Monomeren in einem Poly- oder Oligosaccharid ist der sogenannte Polymerisationsgrad (DP = degree of polymerisation). Um den Polymerisationsgrad zu bestimmen, entnehmen Sie aus den Kurven für die enzymatische und saure Spaltung zu den einzelnen Meßzeiten ($t=0, 3, 6, \text{etc.}$) die Extinktion und bestimmen aus der Glucoseeichgerade die dazugehörigen Glucosekonzentrationen, die den reduzierenden Gruppen entsprechen. Die Glucosegesamt-konzentration (saure Totalhydrolyse) dividiert durch die Glucosekonzentration zu den einzelnen Zeiten ergibt den Polymerisationsgrad (DP). Tragen Sie den DP gegen die Zeit auf. Diskutieren Sie die Ergebnisse.