

Protokoll

Ernährung und Verdauung

Till Biskup

Matrikelnummer: 155567

01. März 2000

Einführung

Enzymkatalysierte Reaktionen hängen von einer Reihe von Faktoren ab, namentlich der Temperatur, dem pH-Wert, dem Vorhandensein von Cofaktoren und, etwa bei der Fettverdauung, der Anwesenheit von Emulgatoren. Diese Abhängigkeiten im Experiment darzustellen, war Aufgabe des vorliegenden Versuches. Insbesondere die Temperaturabhängigkeit und die Wirkung von Cofaktoren wurden anhand menschlicher α -Amylase aus dem Mundspeichel und von Pankreaslipase aus Schweinepankreas untersucht.

Aufgaben

Kohlenhydratverdauung: α -Amylase-Aktivität

1. Erstellen Sie mit vorgegebenen Maltosewerten eine Eichgerade.
2. Bestimmen Sie mit Hilfe der Eichgeraden die gebildete Maltosemenge (μmol) in den verschiedenen Ansätzen. Berechnen Sie die α -Amylase-Aktivität U in Ihrem Originalspeichel gemäß Gleichung (1).

Welche Faktoren können die Enzymaktivität im Speichel beeinflussen? Unter welchen Bedingungen verändern sich Speichelmenge und -zusammensetzung?

3. Temperaturabhängigkeit der α -Amylase-Aktivität
Bestimmen Sie wiederum mit Hilfe der Eichgeraden die α -Amylase-Aktivität im Speichel bei den verschiedenen Inkubationstemperaturen. Tragen Sie die Aktivität U in % gegen die Temperatur T auf.
Legen Sie einen Bereich fest, in dem sich der Q_{10} bestimmen läßt und berechnen Sie den Wert nach Gleichung (2).
4. Welchen Einfluß hat eine Temperaturerhöhung bzw. -erniedrigung auf die Geschwindigkeit von enzymatisch katalysierten Reaktionen?

Lipidverdauung: Pankreaslipase

1. Erläutern Sie kurz die Bedeutung von Emulgatoren für die Fettverdauung.

2. Erläutern Sie die Wirkung von Ca^{2+} und Gallensalzen auf die Aktivität der Pankreaslipase. Tragen Sie dazu in einer Graphik für alle vier Ansätze den Laugenverbrauch in μmol gegen die Zeit auf und berechnen Sie jeweils die Regressionsgerade für den linearen Teil der Kurve. Berechnen Sie die Volumenaktivität U_v des Pankreasextraktes in $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ und die Aktivität U_m pro Gramm Frischgewicht nach Gleichung (3). Diskutieren Sie die Lipaseaktivität in den verschiedenen Ansätzen.

1 Kohlenhydratverdauung: α -Amylase-Aktivität

1.1 Eichgerade

RG — Reagenzglas

Extinktion bei 546 nm		
RG	ΔE	$n_{\text{Maltose}}/\mu\text{mol}$
1	0	0
2	0.258	0.5
3	0.470	1.0
4	0.630	1.5
5	0.810	2.0
6	1.003	2.5

Lineare Regression

$$y = a \cdot x + b \quad a = (0.39 \pm 0.02) \quad b = (0.04 \pm 0.02)$$

$$y = (0.39 \pm 0.02) \cdot x + (0.04 \pm 0.02)$$

1.2 α -Amylase-Aktivität U im Originalspeichel

Bestimmung der volumenbezogenen α -Amylase-Aktivität U_v

$$U_v = \frac{n_{\text{Maltose}}}{t_I \cdot V} \cdot \gamma \quad (1)$$

$U_v/\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$	= volumenbezogene Aktivität
$n_{\text{Maltose}}/\mu\text{mol}$	= Stoffmenge der Maltose
t_I/min	= Inkubationszeit
V/ml	= Volumen der Speichellösung
γ	= Verdünnungsfaktor

α -Amylaseaktivität im Speichel					
RG	γ	E	n_{Maltose}	V	U_v
2	500	0.070	0.0753	0.05	75.33
3	200	0.133	0.2367	0.05	94.70
4	100	0.256	0.5519	0.05	110.38
5	20	1.245	3.0858	0.05	123.43

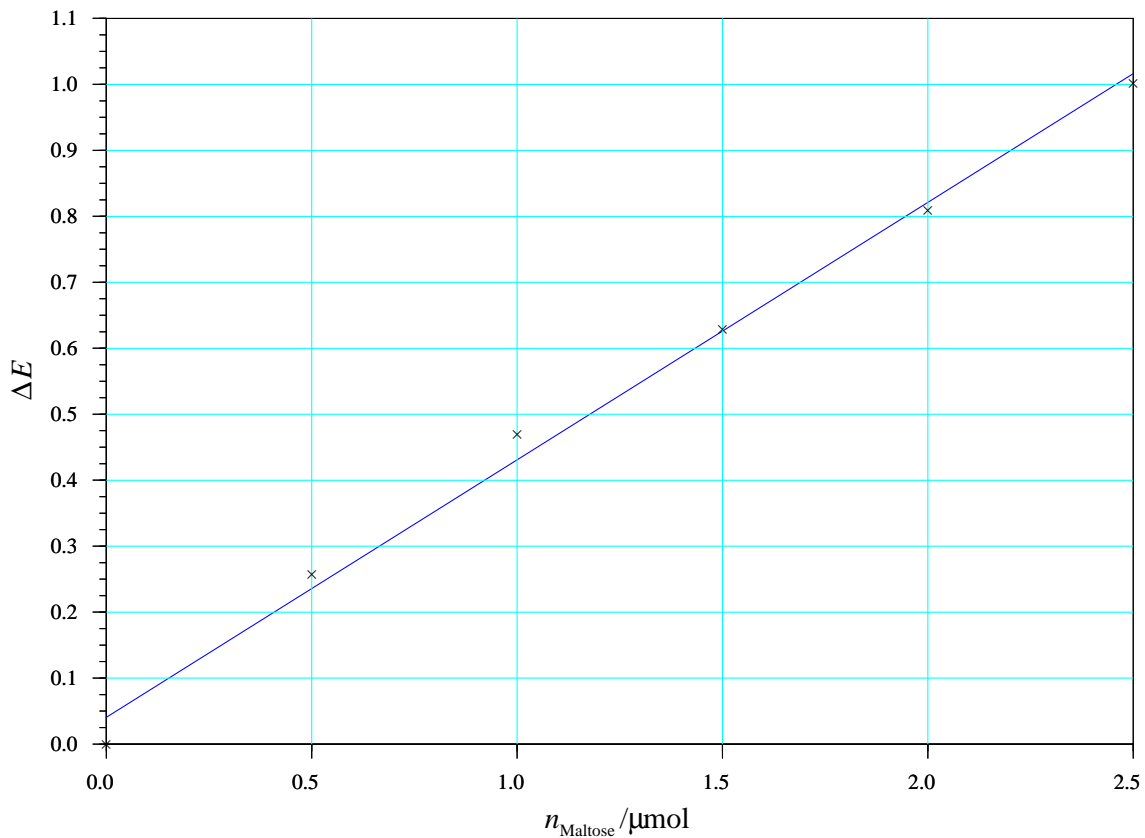


Abbildung 1: Eichgerade der α -Amylase-Aktivität

Als Faktoren, die die Aktivität der α -Amylase beeinflussen können, kommen die Temperatur, der pH-Wert und die Konzentration des Cofaktors, hier Cl^- -Ionen, in Betracht. Für die Temperatur gilt in erster Näherung eine positive Korrelation, mit Einschränkung dahingehend, daß die Aktivität des Enzyms über 40°C deutlich nachläßt, da hier Denaturierung einsetzt, die die räumliche Struktur aufgrund der BROWNSchen Molekularbewegung und den daraus folgenden mechanischen Verspannungen innerhalb des Moleküls aufbricht. Da die räumliche Anordnung insbesondere des aktiven Zentrums aber Voraussetzung für die Entfaltung der enzymatischen Wirksamkeit ist, geht die Aktivität des Enzyms mit der Denaturierung verloren. Der pH-Wert beeinflußt in aller Regel den Dissoziationsgrad der Aminosäure-Seitenketten und durch die so veränderbaren intramolekularen Wechselwirkungen ebenfalls die räumliche Struktur des Enzyms. Der Cofaktor wirkt dagegen meist nur positiv, er kann die Umsatzrate des Enzyms durch Erhöhung der Affinität des Enzyms zu seinem Substrat vervielfachen.

Zu Veränderungen der Speichelmenge und -zusammensetzung kommt es ganz allgemein in Abhängigkeit von der verwerteten Nahrung. Je trockener diese ist, desto mehr und desto wässriger ist der Speichel.

1.3 Temperaturabhängigkeit der α -Amylase-Aktivität

Der Speichel wurde mit K,Na-Phosphatpuffer auf eine volumenbezogene Aktivität

$$U_v = 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$$

verdünnt.

Temperaturabhängigkeit						
RG	$T/^\circ\text{C}$	E	n_{Maltose}	V	U_v	$U_v/\%$
2	0	0.124	0.2137	0.05	42.74	13.69
3	10	0.208	0.4289	0.05	85.78	27.47
4	20	0.418	0.9669	0.05	193.39	61.93
5	37	0.650	1.5614	0.05	312.27	100.00
6	65	0.091	0.1291	0.05	25.83	8.27

Bestimmung des Q_{10}

$$Q_{10} = \left(\frac{V_2}{V_1} \right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}} \quad V_1, V_2 : \text{Aktivität bei der Temperatur } T_1 \text{ bzw. } T_2 \quad (2)$$

Bestimmung des Q_{10}					
	V_2	V_1	T_2	T_1	Q_{10}
1	85.78	42.74	10	0	2.01
2	193.39	85.78	20	10	2.25
3	312.27	193.39	37	20	1.33

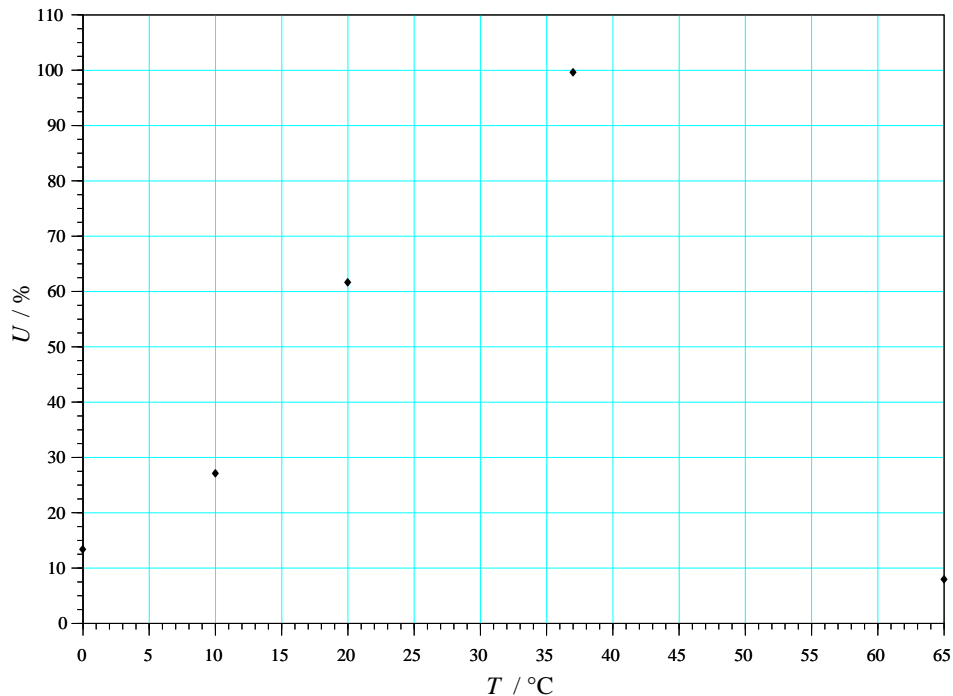


Abbildung 2: Temperaturabhängigkeit der α -Amylase-Aktivität

1.4 Einfluß von Temperaturerhöhung bzw. -erniedrigung

Das Temperaturoptimum der α -Amylase scheint bei 37°C zu liegen, auch wenn man anhand der Staffelung der Meßpunkte nicht im Geringsten davon sprechen kann, dieses Temperaturoptimum wirklich experimentell bestätigt zu haben. Allerdings spricht die Tatsache, daß es sich um menschliche α -Amylase handelt und mit 37°C wohl nicht zufällig genau die Körpertemperatur des Menschen als Meßpunkt gewählt wurde, dafür.

Prinzipiell ist jede Auftragung der Aktivität eines Enzyms gegen die Temperatur eine Optimum-Kurve, die auf beiden Seiten vom Optimum weg mehr oder weniger steil abfällt. In Richtung niedrigerer Temperaturen spielt der gleiche Mechanismus, der auch der sogenannten RGT-Regel zugrunde liegt und der im Q_{10} -Wert Ausdruck findet, eine Rolle: Mikroskopisch betrachtet besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Temperatur und der Schwingung der Atome und Moleküle um ihre Ruhelage, der sogenannten BROWNSchen Molekularbewegung. Je wärmer ein Stoff ist, desto größer ist die kinetische Energie seiner Teilchen und desto höher wird die Chance in einem Reaktionsgemisch, daß sich zwei Reaktionspartner treffen.

Auf enzymatische Reaktionen übertragen bedeutet das gleichzeitig noch, daß der An- und Abtransport des Substrates und der Produkte zum und vom aktiven Zentrum mit steigender Temperatur ebenfalls beschleunigt wird. Wie schon erwähnt, gibt es für Makromoleküle schon relativ bald einen Temperaturbereich, bei dem die kinetische Energie ihrer Atome zu groß wird, als daß die räumliche Struktur des gesamten Moleküls noch aufrechterhalten werden kann. Das trifft in aller Regel für Proteine ab etwa 40°C zu, auch wenn es hier Ausnahmen, insbesondere bei extrem thermophilen Archaea, gibt. Mit der Denaturierung und damit der Zerstörung der räumlichen Struktur endet jegliche enzymatische Aktivität.

2 Lipidverdauung: Pankreaslipase

2.1 Bedeutung von Emulgatoren für die Fettverdauung

Emulgatoren dienen in erster Linie der Oberflächenvergrößerung der Grenzschicht zwischen der wässrigen und der Lipidphase. Sie vergrößern so die Angriffsfläche für Lipasen und sorgen für eine Beschleunigung der Lipidspaltung. Gleichzeitig sorgen sie im Falle der Gallensalze für den Abtransport der Spaltprodukte, so daß die aktiven Zentren der Lipasen möglichst effektiv und ohne größere zeitliche Verzögerungen eingesetzt werden können.

2.2 Wirkung von Ca^{2+} und Gallensalzen auf die Aktivität der Pankreaslipase

Ca^{2+} ist der Cofaktor der Pankreaslipase. Er erhöht die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat durch eine von ihm bewirkte Konformationsänderung erheblich, da er die Bindung der Lipase an Fetttropfen erleichtert. Wie schon im Rahmen der Emulgatoren angesprochen, wirken die Gallensalze sowohl als solche — sie vergrößern die Phasengrenze zwischen wässriger und Lipidphase —, helfen jedoch auch beim Abtransport der Spaltprodukte, insbesondere der Fettsäuren.

Ansätze				
RG	V/ml			
	H ₂ O	Milch	CaCl ₂	Taurocholat
1	35	1	-	-
2	34	1	-	1
3	34	1	1	-
4	33	1	1	1

Ergebnisse

$$[t] = \text{min}$$

$$[V] = \text{ml}$$

$$[n] = \mu\text{mol}$$

Ansatz 1					Ansatz 2				
t	V_{Lauge}	$\sum_{n=1}^t V$	n_{Lauge}	$\sum_{n=1}^t n$	t	V_{Lauge}	$\sum_{n=1}^t V$	n_{Lauge}	$\sum_{n=1}^t n$
1	50	50	0.415	0.415	1	175	175	1.4525	1.4525
2	50	100	0.415	0.83	2	375	550	3.1125	4.565
3	100	200	0.83	1.66	3	575	1125	4.7725	9.3375
4	100	300	0.83	2.49	4	550	1675	4.565	13.9025
5	150	450	1.245	3.735	5	575	2250	4.7725	18.675
6	200	650	1.66	5.395	6	525	2775	4.3575	23.0325
7	250	900	2.075	7.47	7	375	3150	3.1125	26.145
8	275	1175	2.2825	9.7525	8	450	3600	3.735	29.88
9	225	1400	1.8675	11.62	9	375	3975	3.1125	32.9925
10	350	1750	2.905	14.525	10	300	4275	2.49	35.4825

Ansatz 3					Ansatz 4				
t	V_{Lauge}	$\sum_{n=1}^t V$	n_{Lauge}	$\sum_{n=1}^t n$	t	V_{Lauge}	$\sum_{n=1}^t V$	n_{Lauge}	$\sum_{n=1}^t n$
1	225	225	1.8675	1.8675	1	1400	1400	11.62	11.62
2	1350	1575	11.205	13.0725	2	2000	3400	16.6	28.22
3	1450	3025	12.035	25.1075	3	1650	5050	13.695	41.915
4	1950	4975	16.185	41.2925	4	1875	6925	15.5625	57.4775
5	1650	6625	13.695	54.9875	5	1325	8250	10.9975	68.475
6	1875	8500	15.5625	70.55	6	1550	9800	12.865	81.34
7	1250	9750	10.375	80.925	7	1250	11050	10.375	91.715
8	1025	10775	8.5075	89.4325	8	675	11725	5.6025	97.3175
9	925	11700	7.6775	97.11	9	600	12325	4.98	102.2975
10	550	12250	4.565	101.675	10	500	12825	4.15	106.4475

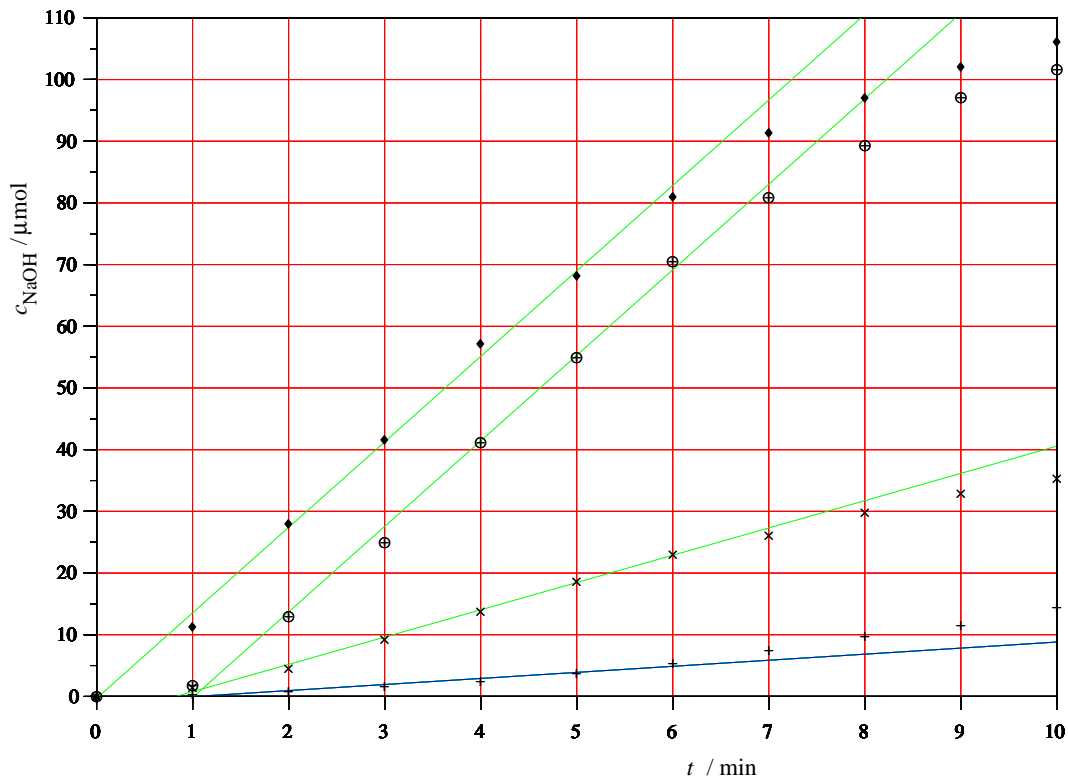


Abbildung 3: Bestimmung der Aktivität U der Pankreaslipase

Lineare Regression

$$y = ax + b$$

$$a = U$$

$$[U] = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$$

Ansatz	Meßpunkte	a	b
1	1-6	1.0 ± 0.1	-1.0 ± 0.4
2	1-6	4.4 ± 0.1	-3.7 ± 0.4
3	1-6	13.9 ± 0.4	-14 ± 1.5
4	1-6	13.9 ± 0.4	0 ± 1.6

Aktivität U_m bezogen auf das Frischgewicht m_f

$$U_m = U_v \cdot \frac{m_f \cdot 0.8 + V_{\text{Eth}}}{m_f} \quad \begin{array}{l} U_m / \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} = \text{massebezogene Aktivität} \\ U_v / \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} = \text{volumenbezogene Aktivität} \\ m_f / \text{g} = \text{Frischgewicht Pancreas (5 g)} \\ V_{\text{Eth}} / \text{ml} = \text{Volumen Ethanol (15 ml)} \end{array} \quad (3)$$

Das pro Meßreihe injizierte Volumen V_I an Pancreasextrakt, das gemäß der Beziehung

$$U_v = \frac{U}{V_I}$$

bestimmt wird, betrug beim vorliegenden Versuch jeweils 0.1 ml

Ansatz	U	V_I/ml	U_v	m_f/g	U_m
1	1.0	0.1	10	0.02	38.0
2	4.4	0.1	44	0.02	167.2
3	13.9	0.1	139	0.02	528.2
4	13.9	0.1	139	0.02	528.2

2.3 Diskussion: Lipaseaktivität in den verschiedenen Ansätzen

Der vorliegende Versuch demonstriert deutlich die Abhängigkeit der Aktivität der Pancreaslipase von Emulgatoren und dem Cofaktor Calcium. Im ersten Ansatz ist nur Milch enthalten, aber kein Calcium und auch kein Emulgator. Der Einwand, Milch enthalte viel Calcium, ist zwar sachlich richtig, tatsächlich ist der Calcium-Gehalt der Milch enorm hoch, aber es liegt an Proteine gebunden vor und steht daher nicht als Cofaktor zur Verfügung.

Im zweiten Ansatz kommt die Funktion des Gallensalzes Taurocholat, den Abtransport der Fettsäuren zu vermitteln, zum Tragen. Der Cofaktor fehlt nach wie vor, die Emulgierung spielt hingegen keine Rolle, da Milch schon eine Emulsion ist.

Die beiden letzten Ansätze schließlich unterscheiden sich nur noch marginal voneinander, in beiden ist als wesentlicher Faktor der Cofaktor Calcium enthalten, der die Aktivität beträchtlich heraufsetzt, der im vierten Ansatz enthaltene Emulgator vermag jedoch trotz seiner zusätzlichen Funktion des Abtransportes der Fettsäuren keine wirklich bedeutende Steigerung der Aktivität mehr.