

## 2 KOHLENHYDRATE

---

### 2.1 Isolierung von Glykogen aus Leber-Säurehydrolysat und Nachweis der Glukose

---

Glykogen ist das hochmolekulare Reservekohlenhydrat tierischer Zellen. Bei hohem Kohlenhydratangebot in der Nahrung wird dieser Speicher aufgefüllt (Glykogen-Synthese), bei Mangel bzw. Absinken des Glukosespiegels im Blut wird Glykogen zu Glukosephosphaten bzw. zu freier Glukose abgebaut (Glykogenolyse). Die Leber enthält etwa 5-10 %, Muskel ca. 1 % des Organgewichts an Glykogen. Nur in der Leber jedoch erfolgt ein Abbau bis zur freien Glukose verbunden mit einer Freisetzung ins Blut. Die Leber ist daher der Lieferant für Blutglukose.

Eine Reihe von Zellen und Geweben (z.B. Erythrozyten, Gehirnzellen) können aus unterschiedlichen Gründen Fettsäuren oder Aminosäuren zur Energiegewinnung nicht verwerten und sind auf Glukose als Substrat angewiesen. Daher wird die Einhaltung eines konstanten Blutglukosespiegels über verschiedene hormonelle Regelvorgänge genau kontrolliert.

Der intrazelluläre Abbau der Glukose erfolgt über einen in allen Zellen gleichartigen Prozess, die Glykolyse. Dabei wird Glukose in Pyruvat umgewandelt. Wie dieses Produkt weiter verwertet wird, hängt von der Art der Zellen und ihren Lebensbedingungen (aerob, anaerob) ab.

#### **Versuchsprinzip:**

Lebergewebe kann in heißer konzentrierter Lauge fast vollständig gelöst werden. Dabei gehen Proteine und Glykogen in Lösung. Durch Zugabe von Ethanol wird Glykogen unlöslich und kann abzentrifugiert werden, während unter diesen Bedingungen die Proteine gelöst bleiben. Durch mehrfaches " Umfällen " kann man so das ausgefallene Glykogen von allen anderen Leberbestandteilen abtrennen.

In Polysacchariden wie Glykogen, Stärke oder Cellulose sind die monomeren Unter-einheiten (Monosaccharide) über glykosidische Bindungen miteinander verknüpft. Solche Bindungen können durch Säuren hydrolysiert werden, und im Hydrolysat kann man die dabei entstandenen Monosaccharide nachweisen, z.B. durch deren reduzierende Wirkung.

#### **Versuchsdurchführung:**

Leberstücke (Schweineleber, Schlachthof) von ca. 1 g Gewicht werden in einem Zentrifugenglas mit 4,0 mL 30 %iger KOH versetzt und im kochenden Wasserbad erhitzt, bis sie sich völlig gelöst haben. Vorsicht: 30 %ige KOH ist stark ätzend.

**ACHTUNG! Schutzbrille! Gläser stets mit einer Klammer halten!**

Die dunkelrote, leicht trübe Lösung wird mit 10 mL 95% igem Ethanol versetzt und nochmals kurz zum Sieden erhitzt. Gut umrühren!

Das Glas unter fließendem Wasser abkühlen, dabei fällt das unlösliche Glykogen aus und wird abzentrifugiert (5 Minuten, 3000 Upm).

Der Überstand wird vorsichtig abgegossen, der Niederschlag nochmals mit 10 mL 95 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert.

Der Überstand wird abgegossen, der Rückstand der Hydrolyse unterworfen.

**Hydrolyse:**

Der Glykogen-Niederschlag wird mit 2 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2,5 mol/L) versetzt und 10 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt. Dabei werden die glykosidischen Bindungen gespalten und Mono- bzw. Oligosaccharide freigesetzt. Nach dem Abkühlen versetzt man den meist noch dunkel gefärbten Ansatz mit 2 Tropfen des Indikators Phenolrot und neutralisiert ihn durch tropfenweise Zugabe von 30 %iger NaOH. (Vorsicht! Starke Erwärmung!). Anschließend wird der Ansatz filtriert.

**Glukosenachweis:**

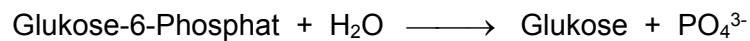
1 mL der neutralisierten und filtrierten Lösung wird mit 1 mL "Benedict'scher Lösung" versetzt und 2 Minuten vorsichtig erhitzt. Benedict'sche Lösung enthält  $\text{CuSO}_4$ , das durch Na-Citrat in alkalischer Lösung komplex gebunden vorliegt. Beim Erhitzen kommt es durch die reduzierende Wirkung der freien glykosidischen Gruppen über eine Endiolisierung zur Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ .

Dabei geht die blaue Farbe in ein schmutziges grün-braun über, und schließlich fällt orangerotes  $\text{Cu}_2\text{O}$  aus.

## 2.2 Bestimmung der Glukose-6-Phosphatase-Aktivität in einem Leberextrakt

---

Das Enzym Glukose-6-Phosphatase katalysiert die hydrolytische Spaltung von Glukose-6-Phosphat in freie Glukose und Phosphat



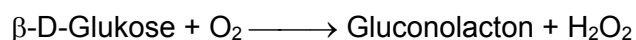
Das Enzym kommt vor allem in der Leber vor. Es fehlt in der Skelettmuskulatur. Die Leber kann mit Hilfe dieses Enzyms aus Glukose-6-Phosphat, das aus dem Glykogenabbau oder der Gluconeogenese stammt, Glukose freisetzen und an das Blut abgeben.

### Versuchsprinzip:

Eine gepufferte Lösung von Glukose-6-Phosphat wird mit einem Leberextrakt (Schweineleber, Schlachthof) bei 37°C inkubiert. In definierten zeitlichen Abständen werden Proben entnommen und in kalte Trichloressigsäure (5%) pipettiert. Dadurch wird die Enzymreaktion abgestoppt. Das gefällte Protein wird abzentrifugiert und im Überstand wird die während der Reaktionszeit gebildete freie Glukose bestimmt. Aus den ermittelten Werten kann die Aktivität des Enzyms berechnet werden.

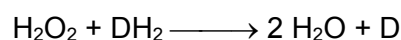
Die Glukosebestimmung erfolgt enzymatisch mit der Glukoseoxidase-Peroxidase-(GOD/POD)-Methode. Glukose wird durch die GOD zu Gluconolacton dehydriert und der Wasserstoff wird auf molekularen Sauerstoff übertragen. Dabei entsteht pro Molekül Glukose ein Molekül Wasserstoffperoxid.

GOD



Das Gluconolacton wird spontan zu Gluconsäure hydrolysiert. Wasserstoffperoxid oxidiert in einer durch Peroxydase (POD) katalysierten Reaktion den Wasserstoffdonator ABTS (2'-Azino-di-3-ethylbenzthiozolin-sulfonsäure(6)-diammoniumsalz) zu einem grünen Farbstoff.  
(D = Donator)

POD



Die Intensität des Farbstoffs ist der Glukosekonzentration proportional. Die Extinktion des Farbstoffs wird bei 578 nm gemessen.

### Versuchsvorbereitung:

Spitze Zentrifugengläser werden mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 beschriftet. Sie werden für die Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA) verwendet ("TCA-Röhrchen").

8 runde Zentrifugengläser werden mit L (Leerwert), S (Standard) und 0, 2, 4, 6, 8 und 10 beschriftet. Sie werden für die Glukosebestimmung verwendet ("Glukose-Röhrchen").

Ein Reagenzglas wird mit G beschriftet. Es ist für den Leberextrakt und das Substrat Glukose-6-Phosphat vorgesehen.

### Versuchsdurchführung:

In die TCA-Röhrchen werden je 1 mL 5% TCA pipettiert und die Röhrchen werden in ein Eisbad gestellt.

In das Reagenzglas G werden 2 mL der eisgekühlten Glukose-6-Phosphat-Lösung (G-6-P) und 100 µL Leberextrakt pipettiert, gemischt und in das Eisbad zurück gestellt. Aus diesem Ansatz werden sofort 200 µL in das TCA-Röhrchen 0 pipettiert, geschüttelt und als Nullprobe im Eisbad stehen gelassen.

Anschließend wird die Glukose-6-Phosphatasereaktion dadurch gestartet, dass man das Reagenzglas G in ein Wasserbad von 37°C stellt. Stoppuhr starten!

Nach exakt 2, 4, 6, 8 und 10 Minuten werden aus der Probe G jeweils 200 µL in die TCA-Röhrchen 2, 4, 6, 8 und 10 pipettiert, geschüttelt und im Eisbad stehen gelassen.

Nach Abschluss der Inkubationszeit werden alle TCA-Röhrchen 5 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert.

Nun wird nach folgendem Schema pipettiert:

	Leerwert	Standard	0	2	4	6	8	10
Reagenzlösung*	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
Standard		50µL						
TCA-Überstand	-	-	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	50µL							

(\*enthält GOD, POD, ABTS, Phosphatpuffer, pH 7,0 )

Alle Gläschen werden gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird die Extinktion aller Proben bei einer Wellenlänge von 578 nm gegen den Leerwert L gemessen.

### Berechnung:

Der Extinktionswert der Probe 0 (Nullprobe) entspricht der Konzentration an freier Glukose im Leberextrakt vor Beginn der Phosphatase-Reaktion. Die Extinktionswerte für die Proben 2, 4, 6, 8 und 10 werden korrigiert, indem von jedem Wert der Extinktionswert der Probe 0 abgezogen wird (ergibt E<sub>kor.</sub>). Tragen Sie die korrigierten Werte ebenfalls in die Tabelle ein.

Mit den korrigierten Werten wird ein Diagramm erstellt.

Ordinate: Extinktion                      Abszisse: Reaktionszeit

Zeichnen Sie durch die erhaltenen Werte eine Gerade, die die Werte möglichst optimal erfüllt und die durch den Nullpunkt geht. Aus dieser Geraden kann die Enzymaktivität in 1 mL Enzymextrakt, angegeben in Internationalen Einheiten (IE = μmol/min), errechnet werden:

$$IE/ ml = \frac{\Delta E}{t} \cdot \frac{c_{St}}{E_{St}} \cdot F_1 \cdot F_2$$

ΔE      korrigierte Extinktion E<sub>kor.</sub> in einer Inkubationszeit t von 1 Minute

c<sub>st</sub>      Konzentration des Glukosestandards = 1 mg/mL = 5,55 mmol/L

E<sub>st</sub>      Extinktion des Glukosestandards

F<sub>1</sub>      Verdünnungsfaktor, der sich aus der Verdünnung des Leberextrakts und der zur Inkubation eingesetzten Menge Enzymansatz G ergibt.

F<sub>2</sub>      Faktor, der sich durch das Verhältnis von Ansatzvolumen nach TCA-Fällung und der Menge ergibt, die zur Glukosebestimmung eingesetzt wird.

$$F_1 = \frac{0,1ml + 2,0ml}{0,2ml} = 10,5$$

$$F_2 = \frac{0,2ml + 1ml}{0,05ml} = 24$$

**Machen Sie sich das Zustandekommen der Formel klar!**

**Geben Sie die Enzymaktivität in Mikrokatal ( μkat ) an.**

## 2.3 Untersuchungen zur optischen Aktivität von Kohlenhydraten

---

Alle Monosaccharide (Ausnahme: Dihydroxyaceton) besitzen eines oder mehrere asymmetrische (chirale) Kohlenstoffatome. Sie treten daher in Stereoisomeren auf, die eine unterschiedliche optische Aktivität besitzen. Dabei unterscheidet man zwischen Enantiomeren, die sich wie Bild und Spiegelbild verhalten, und Diastereomeren.

Solche optische Aktivität kann man mit einem Polarimeter bestimmen. Dabei wird die Schwingungsebene des linear polarisierten Lichtes nach Passieren der optisch aktiven Substanz gedreht, entweder nach rechts (+) oder links (-).

Diese optische Aktivität misst man als spezifische Drehung  $\alpha$ :

$$[\alpha]_D = \frac{\text{Drehung in Grad}}{\text{Schichtdicke x Konzentration}}$$

Aufgabe ist es nun, zuerst die spezifische Drehung  $\alpha$  von D-Glucose, D-Fructose und Saccharose zu bestimmen. Die praktische Durchführung am Polarimeter übernimmt der Assistent.

Dazu werden jeweils die einzelnen Lösungen in die 20 cm lange Küvette gegeben. Es ist darauf zu achten, dass sich bei der Messung keine Luftblasen im Strahlungsgang befinden. Nach dem Einlegen der Küvette kann nun sofort die optische Aktivität in Grad gemessen werden.

D-Glucose: \_\_\_\_\_

D-Fructose: \_\_\_\_\_

Saccharose: \_\_\_\_\_

Zu der Saccharose-Lösung wird nun 0,2 mL einer Invertase-Lösung gegeben. Invertase kann enzymatisch Saccharose zu Glucose und Fructose spalten.

***Messen Sie nun alle 2 Minuten die optische Aktivität.***

***Warum ändert sich diese mit der Zeit?***