

Prinzip

Bei Einwirkung von α -Amylase auf eine verkleisterte Amylopektinlösung nimmt deren Viskosität durch die Spaltung der Stärkemoleküle kontinuierlich ab, was mit einem Rotationsviskosimeter verfolgt werden kann. Die Änderung der reziproken spezifischen Viskosität ist ein Maß für die Aktivität der α -Amylase.

Geräte

DLFU-Mühle, Mahlsplatt 0,2 mm (Feinschroteinstellung)

Waage, Genauigkeit 0,05 g

Wasserbäder 50 °C, 98 °C

Rotationsviskosimeter, vorzugsweise mit Schreiberanschluss oder PC mit Programm für die Ermittlung des Regressionskoeffizienten und Steigung der Regressionsgeraden

Faltenfilter, Ø 32 cm, Whatman 597 ½ oder vergleichbare

Reagenzien

Amylopektin (Anfangsviskosität einer 4,55%igen gelatinierten Reaktionslösung ca. 5 mPa × s)

Phosphatpuffer, 0,1 mol/L, pH 5,7 (Herstellung 0,426 g Na_2HPO_4 und 11,64 g NaH_2PO_4 in 1 L H_2O lösen; pH-Wert ggf. mit 1) mol/L NaOH oder HCl nachjustieren

Natriumchlorid, 5 g/L

Ausführung

Enzymauszug

- 2,5 g Malzfeinschrot in 500 mL 0,5%iger Natriumchloridlösung suspendieren und während 1 h bei 20 °C rühren; (bei Untersuchung von Enzympräparaten ebenfalls in 0,5%iger Natriumchloridlösung suspendieren und während 5 min bei 20 °C rühren)
- Suspension durch Faltenfilter filtrieren
- 2 mL der filtrierten Suspension zur Inkubation verwenden
- wenn Enzymreaktion nicht linear bzw. $1/\eta_s = f(t)$ nicht gerade verläuft, dann Suspension verdünnen

Substrat

- 5,0 g Amylopektin in 100 mL 0,1 mol/L Phosphatpufferlösung während 30 min bei 98 °C verkleistern

Inkubation und viskosimetrische Messung

- 20 mL Substrat und 2 mL filtrierte Suspension (beide 50 °C) mischen und sofort in Messzylinder des Rotationsviskosimeters einfüllen
- Viskosität kontinuierlich oder in Abständen von 2 min während 20 min messen (1. Messung frühestens 6 min nach Zugabe der Suspension ausführen)

Berechnung

$$\eta_s = \frac{\eta_{RL}}{\eta_{LM}} - 1$$

η_s = spezifische Viskosität

η_{RL} = Viskosität der Reaktionslösung

η_{LM} = Viskosität des Lösungsmittels (20 mL 0,1 M Phosphatpufferlösung vom pH 5,7 und 2 mL 0,5%ige Natriumchloridlösung)

$$A = \frac{\Delta 1/\eta_s}{GP}$$

A = Aktivität der α -Amylase in 1 g der Probe

$\Delta 1/\eta_s$ = Änderung der reziproken spezifischen Viskosität der Reaktionslösung in 1 min

GP = Gewicht der eingesetzten Probe im Reaktionssatz in g

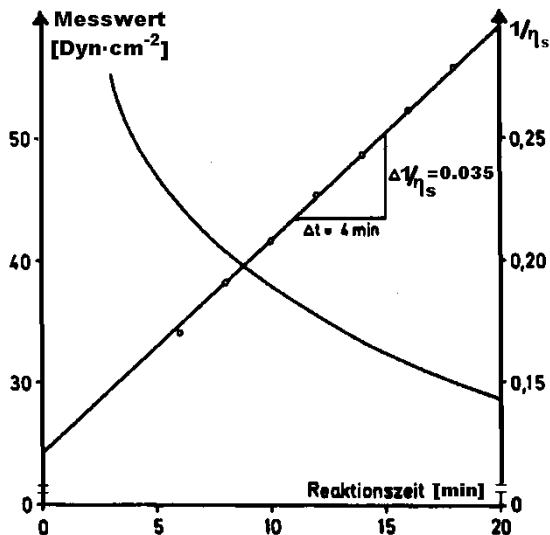
Beispiel:

(mikrobielles Enzympräparat)

Messwerte [$\text{mPa} \times \text{s}$] am Rotationsviskosimeter in Abständen von 2 min ablesen oder Messwerte mittels Schreiber kontinuierlich aufzeichnen (Kurve mit der Form einer Hyperbel, Abbildung 1)

Abbildung 1 – R-200.24.283 [2016-03]:

Messwerte und Reziprokwerte der spezifischen Viskosität in Abhängigkeit von der Zeit



- aus den einzelnen Messwerten durch Multiplikation mit dem gerätespezifischen und von der eingestellten Geschwindigkeitsstufe abhängigen Faktor die entsprechenden Viskositätswerte η_{RL} [$\text{mPa} \times \text{s}$] errechnen
- daraus gemäß $\eta_s = \frac{\eta_{RL}}{\eta_{LM}} - 1$ die einzelnen Werte für die spezifische Viskosität berechnen und deren Reziprokwerte gegen die Zeit auftragen (ansteigende Gerade, Abbildung 1)
- die Steigung der Geraden, ermittelt aus $\Delta(1/\eta_s)/\Delta t$, entspricht der α -Amylaseaktivität, in diesem Beispiel $0,035 : 4 = 0,00875$

Nach Division von 0,00875 durch die Menge des in der Reaktionslösung eingesetzten mikrobiellen Enzympräparates von 1×10^{-5} g ($10 \mu\text{g}/2 \text{ mL}$ Enzymlösung) ergibt sich die α -Amylaseaktivität pro g Probe von 875 Einheiten.

Angabe der Ergebnisse

Bei Zerealien: in Einheiten [$1/\eta_s \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$] mit zwei Dezimalen

Bei Enzympräparaten: in Einheiten [$1/\eta_s \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$] auf 10er-Zahlen gerundet

Genauigkeit

$V_{kr} = \pm 2,5 \%$

Nachweisgrenze $< 0,05$ Einheiten

Normwerte

Helles Malz 2–3,5 Einheiten

Gerste $< 0,1$ Einheiten

Bemerkungen

Aufbewahrung der Suspensionen:

Malzauszug maximal 6–8 h;

Lösungen mikrobieller Enzyme maximal 1–2 h;

Aufbewahrung der gelatinisierten Substratlösung maximal 6–8 h.

Da im Handel kein standardisiertes Amylopektin erhältlich ist, schwanken die Analysenwerte u. U. von Charge zu Charge. Es ist deshalb empfehlenswert, ein neues Amylopektin-Präparat mit dem Ausgangspräparat zu vergleichen. Die Ergebnisse sind dann ggf. mit einem Faktor zu multiplizieren.

Bei der Untersuchung ist darauf zu achten, dass beispielsweise mit Speichel und Schweiß keine α -Amylase eingebracht wird.

Die Enzymkonzentration ist so zu wählen, dass die Änderung der reziproken spezifischen Viskosität während 20 min linear verläuft.

Literatur

1. P. Anderegg, F. Schur, H. Pfenniger, SchwBR 87, 239, 1976