

Kateri od naslednjih odgovorov veljajo za škrob?

| | DA | NE |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|----|
| Škrob se encimsko hidrolizira v želodcu. | | X |
| Škrob se encimsko hidrolizira v tankem črevesu. | X | |
| Amiloza in amilopektin sta monomera, ki sestavljata polimerne molekule škroba. | | X |
| Amiloza in amilopektin sta sestavljena iz glukoznih enot. | X | |
| Celuloza in škrob sta sestavljena iz enakih monomernih enot. | X | |
| Škrob je boljši reducent kot glukoza. | | X |
| Vse komponente škroba so topne v vodi. | | X |
| Vse monomerne enote v škrobu so povezane z α -1,4 glikozidno vezjo. | | X |
| Vse monomerne enote v amilozi so povezane z α -1,4 glikozidno vezjo. | X | |
| | | |

Izračunaj koliko odstotkov škroba vsebuje moka, če si uporabil za analizo 0,80 g moke. Po končani kislinski hidrolizi si hidrolizat razredčil na 50 ml in za encimsko hidrolizo odpipetiral 0,3 ml tega hidrolizata. Po končani encimski hidrolizi si k 0,3 ml hidrolizata dodal 1 ml 3,5-dinitrosalicilne kisline, segreval in razredčil z vodo do 35 ml ter prelił v kiveto. Iz umeritvene krivulje si odčital, da je koncentracija glukoze v kiveti 0,11 mg/ml.

$$\gamma_{kiveta} = 0,11 \frac{mg}{ml} \xrightarrow{m \rightarrow kiveta} 0,11 mg \xrightarrow{mg \rightarrow 35ml} 0,11 mg \times 35 ml =$$

$$= 3,85 mg \times ml \xrightarrow{m \rightarrow 0,3 ml} 12,83 \xrightarrow{50} 641,67 mg$$

$$\gamma_{kiveta} = 0,11 \frac{mg}{ml} \xrightarrow{\gamma_{kiveta} = \gamma_{35ml}} \gamma_{0,3ml} = \gamma_{kiveta=35ml} \times R = 0,11 \frac{mg}{ml} \times \frac{35ml}{0,3ml} = 12,83 \frac{mg}{ml}$$

$$\gamma_{0,3ml} = \gamma_{50ml} \xrightarrow{m_{50ml}} m_{50ml} = \gamma_{35ml} \times V_{50ml} = 12,83 \frac{mg}{ml} \times 50ml = 641,67 mg$$

$$W_{0,8g} = \frac{m_{50ml}}{m_{vzorca}} \times 100 \times F \left(\frac{M_{glukoze} - M_{vode}}{M_{glukoze}} = \frac{180 \frac{g}{mol} - 18 \frac{g}{mol}}{180 \frac{g}{mol}} = 0,9 \right) =$$

$$= \frac{641,67 mg}{800 mg} \times 100 \times 0,9 = 72,19\%$$

Izračunaj koliko odstotkov škroba vsebuje moka, če si uporabil za analizo 0,70 g moke. Po končani kislinski hidrolizi si hidrolizat razredčil na 50 ml in za encimsko hidrolizo odpipetiral 0,25 ml tega hidrolizata. Po končani encimski hidrolizi si k 0,25 ml

hidrolizata dodal 1 ml 3,5-dinitrosalicilne kisline, segreval in razredčil z vodo do 30 ml ter preli v kivetu. Iz umeritvene krivulje si odčital, da je koncentracija glukoze v kivetu 0,11 mg/ml.

$$\gamma_{kiveta} = 0,11 \frac{mg}{ml} \Rightarrow \gamma_{kiveta} = \gamma_{30ml}$$

$$\gamma_{30ml} \times V_{30ml} = \gamma_{0,25ml} \times V_{0,25ml} \Rightarrow \gamma_{0,25ml} = \frac{\gamma_{30ml} \times V_{30ml}}{V_{0,25ml}} = \frac{0,11 \frac{mg}{ml} \times 30ml}{0,25ml} = 13,2 \frac{mg}{ml}$$

$$\gamma_{0,25ml} = \gamma_{50ml} \Rightarrow \gamma_{50ml} = \frac{m_{50ml}}{V_{50ml}} \Rightarrow m_{50ml} = \gamma_{50ml} \times V_{50ml} = 13,2 \frac{mg}{ml} \times 50ml = 660mg$$

$$W_{škroba} = \frac{m_{660mg}}{m_{vzorca}} \times 100 \times 0,9 = \frac{660mg}{700mg} \times 100 \times 0,9 = 84,86\%$$

Izračunaj koliko odstotkov škroba vsebuje moka, če si uporabil za analizo 0,60 g moke. Po končani kislinski hidrolizi si hidrolizat razredčil na 50 ml in za encimsko hidrolizo odpipetiral 0,45 ml tega hidrolizata. Mešanici kislinskega hidrolizata in encimov si dodal 2 ml 3,5-dinitrosalicilne kisline, segreval in razredčil z vodo do 60 ml ter preli v kivetu. Iz umeritvene krivulje si odčital, da je koncentracija glukoze v kivetu 0,072 mg/ml.

$$\gamma_{kiveta} = 0,072 \frac{mg}{ml} \Rightarrow \gamma_{kiveta} = \gamma_{60ml}$$

$$\gamma_{0,45ml} \times V_{0,45ml} = \gamma_{60ml} \times V_{60ml} \Rightarrow \gamma_{0,45ml} = \frac{\gamma_{60ml} \times V_{60ml}}{V_{0,45ml}} = \frac{0,072 \frac{mg}{ml} \times 60ml}{0,45ml} = 9,6 \frac{mg}{ml}$$

$$\gamma_{0,45ml} = \gamma_{50ml}$$

$$\gamma_{50ml} = \frac{m_{50ml}}{V_{50ml}} \Rightarrow m_{50ml} = \gamma_{50ml} \times V_{50ml} = 9,6 \frac{mg}{ml} \times 50ml = 480mg$$

$$W_{škroba} = \frac{m_{480mg}}{m_{vzorca}} \times 100 \times 0,9 = \frac{480mg}{600mg} \times 100 \times 0,9 = 72,0\%$$

Pretvori v ustrezne enote!

$$0,0076 \frac{mg}{dm^3} = 0,0076 \times \frac{10^{-3} g}{10^3 cm^3} \rightarrow 7,6 \times 10^{-9} \frac{g}{cm^3} = 7,6 \times 10^{-9} \times \frac{10^{-3} kg}{10^{-6} m^3} \rightarrow 7,6 \times 10^{-6} \frac{kg}{m^3}$$

$$0,045 \frac{mol}{min} = 0,045 \times \frac{10^6 \mu mol}{\frac{1}{60} h} \rightarrow 2,7 \times 10^6 \frac{\mu mol}{h} = 2,7 \times 10^6 \times \frac{10^{-3} mmol}{3600 s} \rightarrow 0,75 \frac{mmol}{s}$$

Na vajah bomo izvajali kislo in encimsko hidrolizo škroba v moki. Po prvi fazi (kisla hidroliza) bomo vzorec nevtralizirali z NaOH. Zakaj?

Vzorec bomo po »delni« kisli hidrolizi nevtralizirali z NaOH zaradi tega, da bomo pripravili ugoden »življenjski prostor« za encime, ki jim bomo dodali po dodatku baze. Če medije nebi nevtralizirali bi s tem uničili oz. denaturirali vse dodane encime in s tem nebi naredili nič.

Pojasni kako bomo na vaji hidrolizirali škrob!

Za hidrolizo škroba se bomo poslužili dveh reakcij oz. bomo izkoriščali lastnosti dveh substanc in sicer kisline (kemična hidroliza) ter encima (biološka oz. encimska hidroliza). Hidrolizi ne smemo združiti ampak jim moramo izvajati v točno določenem vrstnem redu zaradi specifičnosti oz. agresivnosti kisline in encima. Hidroliza škroba poteka tako, da vzorec najprej raztopimo in mu dodamo kislino (ne preagresivno) in pustimo kratek čas na kuhalni plošči (s toploto povečamo učinek kislinske hidrolize, saj pride do hitrejšega gibanja molekul kisline in s tem do večjih interakcij). V tem času kislina prične cepiti glikozidne vezi (vezi vse vezi, ki ji pridejo pod »roke«). Ravno zaradi tega, ker kislina ni specifična za cepitev samo določene vrste vezi ampak cepi vse vezi (tiste v škrobu, katere želimo cepiti in celo tiste katerih nočemo cepiti oz. bi nam kvarile rezultat → npr. celuloza je takšen polisaharid). Zaradi tega izvajamo hidrolizo s kislino samo določen čas potem pa raztopino ohladimo in ji pričnemo dodajati bazo in sicer jo dodajamo toliko časa dokler ne dosežemo nevtralen pH. Takšen pH želimo doseči zaradi naslednjega analitskega koraka in sicer zaradi encimske hidrolize. Encimi so »živa« stvar in so zato občutljivi na pH okolja. Encimi (α -amilaze in amiloglukozidaze), ki jih bomo uporabljali pri encimski hidrolizi škroba se v naravnem okolju nahajajo v ustih in tankem črevesu sesalcev, kjer se pH giblje okoli nevtralnega oz. celo rahlo bazičnega. S tem, ko dodajamo bazo v naš vzorec pripravljamo optimalno življenjsko okolje za naš encim. Ko dosežemo optimalen pH dodamo najprej encim α -amilaza, ki cepi verige, ki so povezane z α -1,4 vezi na krajše fragmente. Potem damo vzorec na kuhalnik in segrejemo do 55 °C. Ta temperatura je optimalna za encim amiloglukozidaza, ki cepi fragmente, ki jih je predhodno cepila α -amilaze. Lastnost tega encima je, da prav tako cepi α -1,4 vez vendar tudi α -1,6 na še manjše fragmente oz. na osnovne gradnike → glukozo. Lastnost tega encima je tudi, da cepi fragmente iz koncev proti sredini. Po določenem času prekinemo reakcijo in vzorcu dodamo 3,5-dinitrosalicilno kislino. Nastala glukozna je zelo močan reducent in tako zreagira z omenjeno kislino pri čemer se tvori barvni produkt, ki ga lahko kvantitativno ovrednotimo s pomočjo umeritvene krivulje.

Pojasni kakšna je kemijska sestava škroba (monomerne enote, vezi)!

Škrob je energijsko rezervna molekula značilna za rastlinski svet in nastaja v temotnih reakcijah fotosinteze v kloroplastih. Škrob je zgrajen iz monosaharidov (glukoze), ki so povezani med seboj in tvorijo značilno mrežasto strukturo. Glede na strukturo ločimo dve vrsti polisaharidov znotraj škroba in sicer prvi je amilopektin (približno 80 %), ki je v vodi netopen in pri povezovanju glukoznih enot tvori α -1,4 ter α -1,6 vezi. Druga molekula je amiloza (približno 20 %), ki je v vodi topna. Glukozne enote so linearno povezane kar pomeni da se med seboj povezujejo samo z α -1,4 vezmi.

Predpostavi, da si pri vaji določevanja škroba v moki naredil napako. Tako vzorec kot raztopina za umeritveno krivuljo si v prisotnosti 3,5-dinitrosalicilne kisline segreval 3 minute namesto 5 minut. Na osnovi izmerjenih absorbanč si določil, da je v moki 80 % škroba, ne da bi upošteval, da po 3 minutah nastane le 70 % obarvanega produkta (po 5 min je ta delež 100 %). Koliko odstotkov dejansko vsebuje moka?

Moka vsebuje točno toliko odstotkov škroba kolikor smo ga določili z analizo, torej 80 %, kljub temu, da smo vzorec segrevali le 3 min. Rezultat je v tem primeru enak zaradi naslednjega dejstva in sicer, da smo »napako«, torej segrevali krajši čas kot bi morali, naredili tako v vzorcu kot pri raztopinah s katerimi smo potem naredili umeritveno krivuljo in zaradi tega se napaki »izničita« ter tako dobimo pravi podatek o vrednosti škroba v moki. Če pa bi napako naredili ali samo v vzorcu ali samo v raztopinah za umeritveno krivuljo pa končni rezultati nebi bili isti.

Na vajah smo hidrolizo škroba izvajali na različne načine. Naš namen je bil, da ugotovimo pomen posameznih postopkov (dodatek kisline, segrevanje, prisotnost encimov) na uspešnost hidrolize. Napiši izmerjene absorbance in komentiraj pomen posameznih postopkov za uspešen potek hidrolize!

| | Dodatek HCl | Kuhanje | Encimska hidroliza | A |
|---|-------------|---------|--------------------|-------|
| 1 | X | X | X | 0,469 |
| 2 | X | X | | 0,394 |
| 3 | X | | X | 0,103 |
| 4 | X | | | 0,00 |
| 5 | | X | X | 0,269 |
| 6 | | X | | 0,011 |
| 7 | | | X | 0,111 |
| 8 | | | | 0,001 |

- 1) Vsi tri dejavniki v posameznih stopnjah zagotavljajo idealne pogoje hidrolize kar posledično pripelje do veliko produktov, kar se vidi na izmerjeni absorbanci.
- 2) V tej fazi opravljamo samo kemično hidrolizo pri optimalnih pogojih (visoka temperatura). Pri tej hidrolizi, če jo izvajamo daljši čas se pričnejo cepiti tudi vezi v celulozi. Vsekakor dobimo tudi veliko produkta kar se ponovno pokaže v visoki absorbanci.
- 3) V tej fazi opravljamo tako kemijsko kot encimsko hidrolizo vendar s to razliko, da ne zagotavljamo maksimalnih pogojev. Postopek hidrolize je takšen, da najprej izvedemo kemijsko hidrolizo, da razcepimo večje verige škroba potem pa še encimsko hidrolizo, da lahko te nastale fragmente cepijo do glukoznih enot. Vendar v našem primeru nismo kemijsko hidrolizo izvajali pri visokih temperaturah, zato kemijska hidroliza ni bila tako učinkovita in posledično se je tvorilo manj fragmentov in s tem imajo encimi veliko več dela za razgradnjo kar se kaže v tem, da nastaja manj produktov in posledično je manjša absorbanca.
- 4) V tem primeru se jasno vidi, da za kislinsko hidrolizo nujno potrebujemo tudi toplotno energijo saj kislina sama po sebi ne razgrajuje škroba kar se vidi pri dobljeni absorbanci iz katere se vidi, da se ni tvorilo nič produktov.

- 5) V tem primeru se pokaže delni učinek kuhanja ter encimov. Absorbanca je višja kot pri primeru kjer smo izvajali npr. samo kuhanje ali samo encimsko hidrolizo.
- 6) Samo kuhanje na razgradnjo škroba nima bistvenega vpliva. Mogoče se ga zelo zelo malo razgradi do glukoznih enot katere nato tvorijo barven produkt, ki jih izmerimo s spektrofotometrom.
- 7) Tukaj je še en dokaz, da so encimi sami sposobni razgrajevati škrob saj se tvori kar nekaj produktov, ki jih kvantitativno ovrednotimo.
- 8) V tem primeru se naj nebi tvorilo nič produktov, saj ni dodanih nobenih encimov oz. ni bila izvedena predhodna kemijska hidroliza. Možne napake, ki so povzročile zaznavo absorbance na tretji decimalki so pa lahko:
 - a. napaka spektrofotometra,
 - b. napaka med analitskim postopkom,
 - c. mogoče je bila v škrobu že kakšna prosta glukoza in
 - d. lahko se je zgodilo, glede na to, da zrno v sebi vsebuje encime za razgradnjo škroba, ki jih uporabi pri kaljenju kalčka, da pri mletju ni bil popolnoma odstranjen ta del zrna in je tako kakšen encim uspel zaiti v moko in se sedaj med analizo aktiviral.