

Enzymatyczna metoda otrzymywania D-glukozy ze skrobi

Prowadzący: dr inż. Gabriela PASTUCH-GAWOLEK

Miejsce ćwiczenia: sala 102

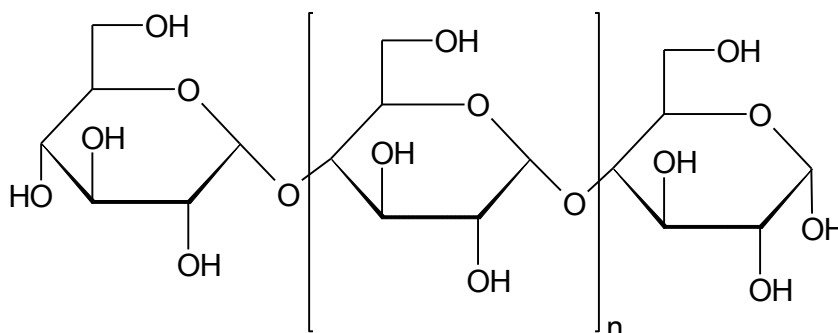
CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest otrzymanie D-glukozy ze skrobi z wykorzystaniem hydrolizy enzymatycznej.

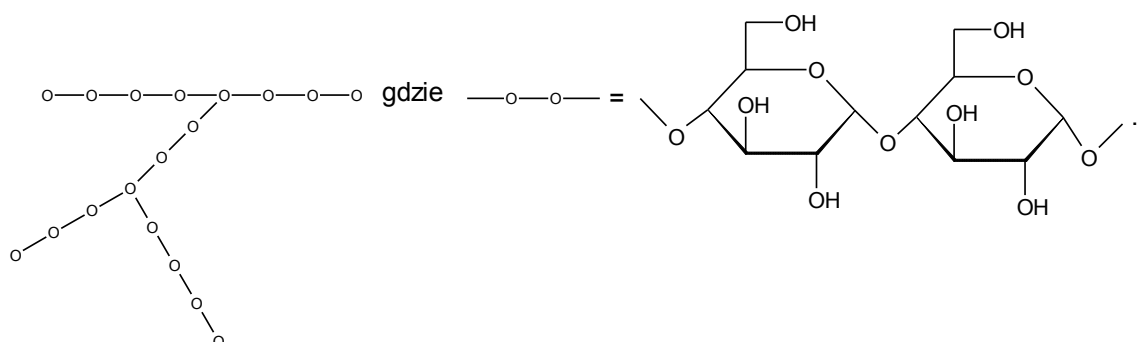
PODSTAWY TEORETYCZNE

Skrobia jest polisacharydem zbudowanym z cząsteczek D-glukozy, które są połączone wiązaniami α -glikozydowymi. Jest ona obecna w roślinach, gdzie pełni rolę nośnika energii niezbędnego w większości procesów metabolicznych.

Skrobia jest zbudowana z dwóch składników strukturalnych amylozy i amylopektyny. Amyloza tworzy proste, długie łańcuchy o masie cząsteczkowej od 4000 do 15000 Da. Reszty glukozytowe są przyłączane w niej wyłącznie wiązaniami 1 \rightarrow 4- α -glikozydowymi.



Natomiast amylopektyna jest tworem rozgałęzionym zbudowanym z krótkich, prostych łańcuchów, złożonych z około 30 jednostek glukozy połączonych wiązaniami 1 \rightarrow 4- α -glikozydowymi, a między sobą powiązanych wiązaniami 1 \rightarrow 6- α -glikozydowymi. Dzięki obecności tych wiązań jednym z produktów hydrolizy amylopektyny jest izomaltoza. Masa cząsteczkowa amylopektyny jest znacznie większa niż amylozy i przekracza 500 kDa, a sięga nawet do 100000 kDa.



Skrobia jest typowym polisacharydem zapasowym roślinnym i występuje w ziemniakach, ziarnie zbóż i nasionach wielu innych roślin. Tworzy różnego rodzaju granulki różniące się w zależności od źródła pochodzenia oraz sposobu wydzielania. Większość granulek składa się z kolejnych warstw, które ulegają asocjacji mając postać ziarenek widocznych pod mikroskopem. Stosunek amylozy i amylopektyny jest zasadniczą cechą poszczególnych gatunków skrobi. W tabelicy podano niektóre własności skrobi.

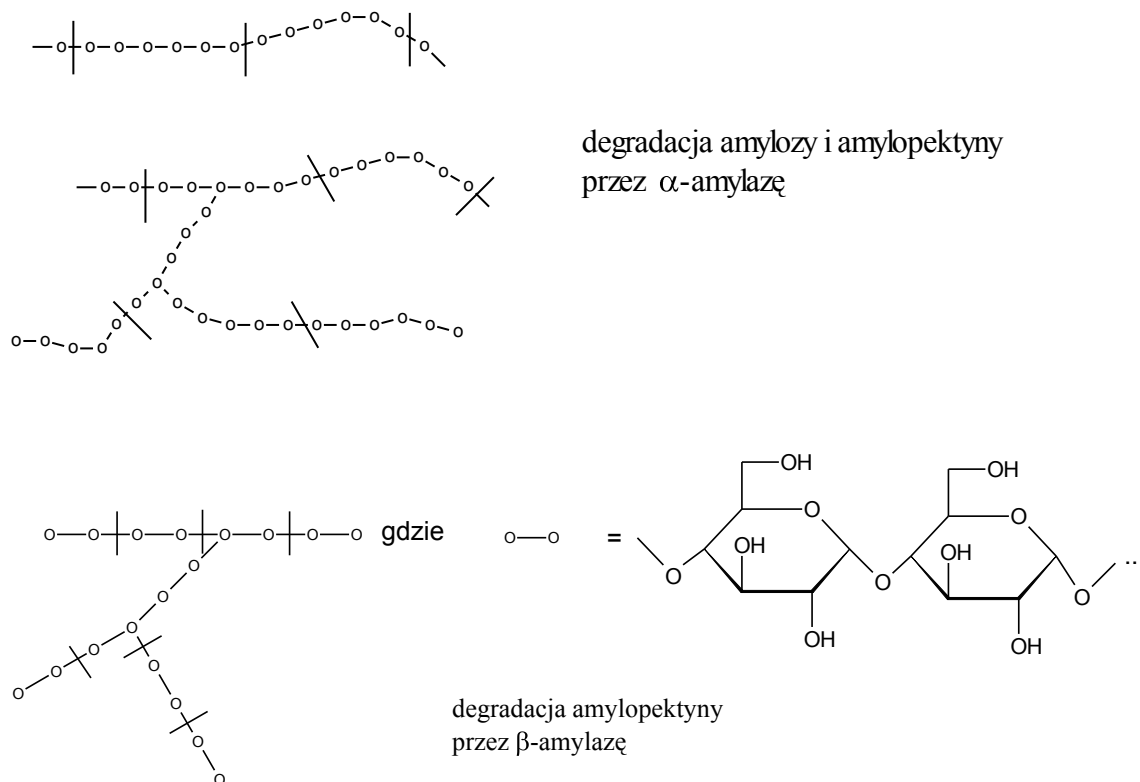
Źródło	Kształt	Wielkość [μm]	Amyloza [%]
Algi	kulisty	15	1
Owies	kulisty	25	27
Kukurydza	kulisty	25	52
Jęczmień	kulisty	20	22
Pszenica	kulisty	30	28
Ziemniaki	owalny	40	23
Groch	owalny	40	66

Z przytoczonego zestawienia widać, że jedynie dla pewnych odmian kukurydzy i grochu wartość amylozy przekracza 50%. Ma to istotny wpływ na zdolność hydrolizy skrobi przez enzymy i w konsekwencji na zdolność przyswajania skrobi przez organizmy.

W procesie metabolizmu skrobi pierwszym stadium jest rozkład enzymatyczny na mniejsze fragmenty. Typowymi enzymami trawiennymi, występującymi w ślinie i wydzielinie trzustki kręgowców są amylazy, które katalizują rozkład skrobi i glikogenu do maltozy lub glukozy. Są one również obecne w roślinach, zwłaszcza w zarodkach ziarna zbóż, gdzie w procesie kiełkowania następuje ich gwałtowna synteza, mająca na celu szybkie uruchomienie energetycznego materiału zapasowego; znalazło to zastosowanie przy otrzymywaniu słodu.

Znane są różne rodzaje amylaz, spośród nich głównymi są: α -amylaza zaliczana do endoamylaz oraz β -amylaza i glukoamylaza zaliczane do grupy egzoamylaz.

Wszystkie rodzaje amylaz katalizują hydrolizę wiązań 1-4- α -glikozydowych, a zgodnie z nazwą endoamylazy, α -amylaza atakuje wiązania znajdujące się wewnątrz łańcucha, natomiast β -amylaza i glukoamylaza, jako egzoamylazy, rozrywają odpowiednio co drugie lub kolejne wiązania glikozydowe, poczynając od nieredukującego końca łańcucha.

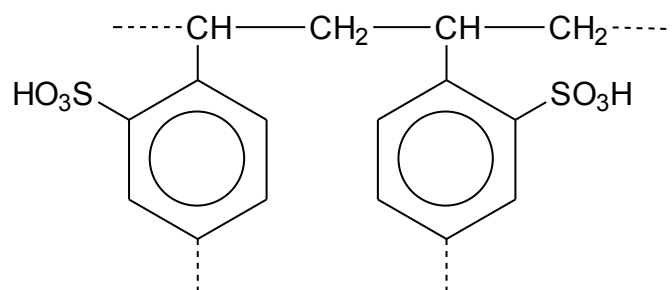


Skrobia zawiera obok frakcji amylozy, również frakcję amylopektyny, złożoną z łańcuchów rozgałęzionych. Ponieważ wiązania 1-6- α -glikozydowe, występujące przy rozgałęzieniach w amylopektynie, stanowią barierę dla działania β -amylazy, rozkład tej frakcji skrobi jest inny: boczne łańcuchy są rozkładane przez β -amylazę do maltozy, podobnie jak prosty łańcuch amylozy, po czym reakcja zatrzymuje się na rozgałęzionych wiązaniach 1 \rightarrow 6. Powstaje więc nierozłożona, wielkocząsteczkowa dekstryna graniczna, która stanowi około 40-45% masy amylopektyny i wykazuje znaczną lepkość w roztworze i fioletową barwę kompleksu z jodem. Rozkładowi ulega ona dopiero przy łącznym działaniu obu enzymów, gdyż α -amylaza przeskakuje przez wiązania 1 \rightarrow 6- α -, tworząc nowe, proste łańcuchy, które mogą już być rozkładane przez β -amylazę.

Tak więc, w wyniku łącznego działania α - i β -amylaz skrobia ulega hydrolizie do maltozy i izomaltozy, czyli α -D-glukozylo-1 \rightarrow 6-glukozy, oraz niewielkiej ilości wolnej glukozy. Zarówno sok jelitowy, jak i ziarna zbóż zawierają również 1 \rightarrow 4- α -glukozydazę i 1 \rightarrow 6- α -glukozydazę (izomaltazę), enzymy te rozkładają wytworzone disacharydy do cząsteczek glukozy, która jest końcowym produktem rozkładu enzymatycznego skrobi. Najlepiej radzi sobie z amylopektyną (i glikogenem) glukoamylaza występująca w grzybach oraz u zwierząt. Rozkłada ona zarówno wiązania 1 \rightarrow 4- α -, jak i 1 \rightarrow 6- α -glikozydowe i dlatego przy jej udziale amylopektyna i glikogen ulegają rozkładowi do glukozy.

Liczne grzyby nitkowate, bytujące w środowiskach bogatych w polisacharydy, są zdolne do syntezy i wydzielania znacznych ilości amylaz; jest to wykorzystywane przy technicznym ich otrzymywaniu.

Inną drogą pozwalającą uzyskać glukozę z częściowo zhydrolizowanej przez enzymy skrobi jest hydroliza kwaśna oligosacharydów. Szczególnie dogodnie jako katalizatory są tzw. kationity mocno kwaśne. Są to zwykle kopolimery styrenu i dwuwinylobenzenu, zawierające grupy sulfonowe. Fragment żywicy można przedstawić wzorem:



WYKONANIE ĆWICZENIA

Zadanie 1. Oznaczanie aktywności amylazy.

Sprzęt:

- ♦ statyw z probówkami,
- ♦ pipety,
- ♦ lejki,
- ♦ sączi karbowane,
- ♦ spektrofotometr,
- ♦ łaźnia wodna,
- ♦ waga analityczna.

Material i odczynniki:

- ♦ preparat enzymatyczny
- ♦ substrat skrobiowy. 0.5g skrobi rozpuszczalnej, 1 g NaCl i 2 g cytrynianu sodu rozpuścić w 100 ml wody ogrzewając do wrzenia. Dodać 1g benzoesu sodu dla konserwacji,
- ♦ 0.9% roztwór NaCl,
- ♦ 20% roztwór kwasu sulfosalicylowego,
- ♦ roztwór jodu. 2g KI rozpuścić w 5 ml wody i w tym roztworze rozpuścić 1g jodu, po czym uzupełnić wodą do 300ml. Rozcieńczyć r-r macierzysty 150 razy,
- ♦ 1% roztwór skrobi. 1g skrobi rozpuścić w 80 ml wrzącej wody. Po rozpuszczeniu ostudzić i uzupełnić wodą do 100 ml.
- ♦ Roztwory wzorcowe zawierające 2,4,6 i 8 mg skrobi w 1 ml. Rozcieńczyć 1% roztwór skrobi (10 mg/ml) biorąc 2,4,6 i 8 ml i uzupełniając wodą do 10 ml.

Wykonanie ćwiczenia:

Zasada oznaczenia:

Oznacza się ilość rozłożonego substratu (skrobi) na podstawie stopnia zmniejszenia się zabarwienia z jodem. Wynik podaje się w jednostkach Wohlgemutha, oznaczających taką aktywność amylazy w 1 ml badanego preparatu, która rozkłada 1 mg skrobi do produktów nie dających zabarwienia z jodem, w ciągu 30 minut, w temperaturze 37°C, w obecności jonów chlorkowych.

Wykonanie:

2.4 ml substratu skrobiowego ogrzać do 37°C przez wstawienie do łaźni na 10 minut i wprowadzić następnie 0.1 ml preparatu enzymatycznego. Inkubować w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 30 minut. Dodać 2.5 ml roztworu kwasu sulfosalicylowego. Po kilku minutach przesączyć roztwór do probówki.

Równoległe wykonać próbę kontrolną biorąc 2.4 ml substratu, 0.1 ml preparatu enzymatycznego i dodając natychmiast (bez inkubacji) 2.5 ml roztworu kwasu sulfosalicylowego. Przesączyć analogicznie jak poprzednia próbkę.

Do 0.5 ml przesączu próby badanej i kontrolnej wprowadzić (roztwór odmierzony do probówki) 9.5 ml rozcieńczonego 150-krotnie roztworu jodu. Oznaczyć wartość absorbancji przy długości fali 560 nm wobec wody. Odjąć wartość absorbancji próby badanej od wartości absorbancji próby kontrolnej i z krzywej kalibracyjnej odczytać wynik w jednostkach Wohlgemutha.

Wykreślenie krzywej kalibracyjnej.

Do 0.1 ml roztworów wzorcowych zawierających 2, 4, 6, 8 i 10 mg skrobi/ml wprowadzić po 0.15 ml 0.9% roztworu NaCl, 0.25 ml roztworu kwasu sulfosalicylowego i 9.5 ml rozcieńczonego 150-krotnie roztworu jodu. Oznaczyć wartość absorbancji wobec wody i wykreślić krzywą, odkładając na osi odciętych jednostki Wohlgemutha.

W poszczególnych probówkach znajdowało się 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 i 1 mg skrobi, a ponieważ do wywołania barwy wychodzi się z 0.5 ml przesącza, co odpowiada 0.01 ml preparatu enzymatycznego, wyniki w jednostkach Wohlgemutha wyniosą: 20, 40, 60, 80 i 100.

Wartości fizjologiczne: do 30 j. W. W surowicy, do 40 j. W. W moczu, a w soku trzustkowym 500-1500 j. W.

Zadanie 2. Enzymatyczna degradacja skrobi.

- ♦ Sprzęt:
- ♦ kolby stożkowe,
- ♦ pipety,
- ♦ wata,
- ♦ sączi karbowane,
- ♦ lejki,
- ♦ cieplarka,
- ♦ kolba okrągłodenna,
- ♦ chłodnica zwrotna,
- ♦ mieszadło,
- ♦ papierki wskaźnikowe,
- ♦ waga analityczna.

Material i odczynniki:

- ♦ preparat enzymatyczny
- ♦ skrobia kukurydziana lub ziemniaczana

Wykonanie ćwiczenia:

Hydrolyza skrobi:

W kolbie stożkowej o pojemności 100-250 ml, umieścić 5g skrobi kukurydzianej lub ziemniaczanej, dodać 50 ml wody destylowanej i 0.5 ml preparatu enzymatycznego. Zawartość kolby ogrzewać do zżelowania w łaźni o temperaturze 80°C. Następnie całość ochłodzić i dodać 1 ml preparatu enzymatycznego. Kolbkę zatkać korkiem z waty i mieszać jej zawartość przez 3 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie wstawić kolbkę do cieplarki ustawionej na 37°C i pozostawić na 24-72h. Następnie zawartość kolbki ogrzać do wrzenia w celu zdenaturowania enzymu, a po ochłodzeniu przesączyć zawartość kolbki, a objętość uzyskanego przesącza dokładnie zmierzyć (będzie to potrzebne do obliczenia sumarycznej ilości cukrów redukujących), pobrać próbki do oznaczenia cukrów redukujących (dwie próbki po 0.5 ml). Pozostałą ilość przesącza zateżyć w zważonej kolbie okrągłodennej na wyparce rotacyjnej i określić masę pozostałości.

Zadanie 3. Oznaczanie cukrów redukujących metodą Somogyi.

Sprzęt:

- ♦ kolby stożkowe,
- ♦ pipety,
- ♦ lejki,
- ♦ biureta,
- ♦ łaźnia wodna,
- ♦ waga analityczna.

Material i odczynniki:

- ♦ odczynnik Somogyi:
- ♦ Roztwór A- 15 g winianu sodowo-potasowego i 15 g bezwodnego węglanu sodu rozpuścić w 100 ml gorącej wody i dodać 40 ml 1 N NaOH.
- ♦ Roztwór B- 4 g pięciowodnego siarczanu miedzi rozpuścić w 40 ml wody i ogrzać do wrzenia
- ♦ Roztwór C- 90 g bezwodnego siarczanu sodu rozpuścić w 250 ml wody

Roztwory A, B i C połączyć ze sobą, dodać 4 g jodku potasu oraz 0.6 g jodanu potasu w 10 ml wody. Wymieszać i uzupełnić wodą do 500 ml.

- ♦ 0.01 N tiosiarczan sodu. Przygotować bezpośrednio przed użyciem przez dziesięciokrotne rozcieńczenie 0.1 N mianowanego roztworu tiosiarczanu.
- ♦ 1 M kwas siarkowy
- ♦ wskaźnik skrobiowy. 500 mg skrobi rozpuszczalnej rozpuścić w 50 ml wody ogrzewając całość do wrzenia. Po ochłodzeniu dodać 15 g chlorku sodowego.
- ♦ glukoza. 100 mg glukozy rozpuścić w 100 ml wody destylowanej (w kolbie miarowej). Do wykonania krzywej wzorcowej pobierać odpowiednio: 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 i 2.0 ml tego roztworu.

Wykonanie ćwiczenia:

Do kolby stożkowej o pojemności 50 ml zawierającej badany roztwór (0.5 ml) dodać 5 ml odczynnika Somogyi i po dokładnym wymieszaniu zawartość ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 15 minut. Po wyjęciu z łaźni próbkę ochłodzić pod bieżącą wodą. Następnie dodać 2 ml 1M kwasu siarkowego i wstrząsnąć energicznie aż do rozpuszczenia osadu. Po upływie 5 minut zawartość próbek zmiareczkować 0.01 N tiosiarczanem sodu wobec wskaźnika skrobiowego. Równolegle wykonać dwie próby kontrolne (zawierające wodę destylowaną zamiast badanego roztworu).

Zawartość cukrów redukujących w próbach badanych odczytać z krzywej wzorcowej. Aby sporządzić taką krzywą, należy wykonać w opisany powyżej sposób serię oznaczeń dla prób wzorcowych zawierających 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 i 2.0 mg glukozy w próbce. Wykreślić zależność pomiędzy ilością cukru w próbce badanej (w mg) a **różnicą** zużycia roztworu tiosiarczanu na zmiareczkowanie próby kontrolnej i badanej (w ml).

Po odczytaniu z krzywej wzorcowej ilości cukrów redukujących w pobranej próbce przeliczyć, jaka jest ich zawartość w całej objętości roztworu. Wynik uzyskany z oznaczania ilości cukrów redukujących porównać z masą uzyskaną po zateżeniu przesączy. Przeanalizować uzyskane wyniki i wyjaśnić ewentualne różnice pomiędzy masą uzyskaną z obliczeń i masą uzyskaną w wyniku zateżenia.

Literatura źródłowa:

J. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, Biochemia, Wyd. Naukowe PWN, W-wa 2005

L. Kłyszajko-Stefanowicz, Ćwiczenia z Biochemii, Wyd. Naukowe PWN, W-wa 1982

R. L. Whistler, M. L. Wolfrom, Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. I, Academic Press Inc. NY and London, 1963