



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Enzymatyczna hydroliza skrobi do produktów małowcząsteczkowych

Instrukcja do zajęć laboratoryjnych z przedmiotu
Chemia Bioorganiczna i Bionieorganiczna
Dla studentów kierunku Chemia specjalność Chemia Bioorganiczna

Opracowanie: mgr inż. Marta Grec
dr inż. Gabriela Pastuch-Gawołek

Materiały zostały wykonane w ramach realizowanego na Politechnice Śląskiej projektu nr UDA-POKL.04.01.01-00-114/09-01 pt.: „Unowocześnienie i rozszerzenie oferty edukacyjnej na kierunku Chemia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej – otwarcie specjalności Chemia Bioorganiczna” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

CEL ĆWICZENIA

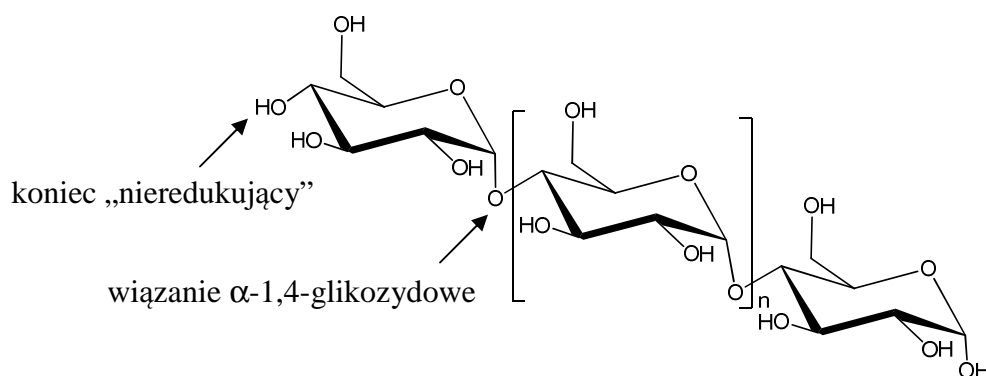
Celem ćwiczenia jest zastosowanie preparatów enzymatycznych do hydrolizy skrobi, ocena właściwości uzyskanych produktów oraz zbadanie wpływu różnych czynników (temperatura, czas reakcji, dodatek aktywatorów, rodzaj preparatu enzymatycznego) na efektywność procesu hydrolizy skrobi.

PODSTAWY TEORETYCZNE

Skrobia stanowi najcenniejszy materiał zapasowy roślin (pełni rolę nośnika energii niezbędnego w większości procesów metabolicznych) oraz jest bardzo istotnym składnikiem żywnościowym w diecie ludzi i zwierząt.

Analizując jej budowę można stwierdzić, że jest ona homopolimerem polisacharydowym zbudowanym z cząsteczek D-glukozy, które są połączone wiązaniami α -glikozydowymi. Nie stanowi ona jednak jednorodnego związku lecz jest mieszaniną różnych strukturalnie polimerów: amylozy i amylopektyny.

Zwykło się przyjmować, że amyloza tworzy proste, długie łańcuchy o masie cząsteczkowej od 4 do 15 kDa. Reszty glukozytowe są przyłączane w niej wyłącznie wiązaniami **α -1,4-glikozydowymi**.



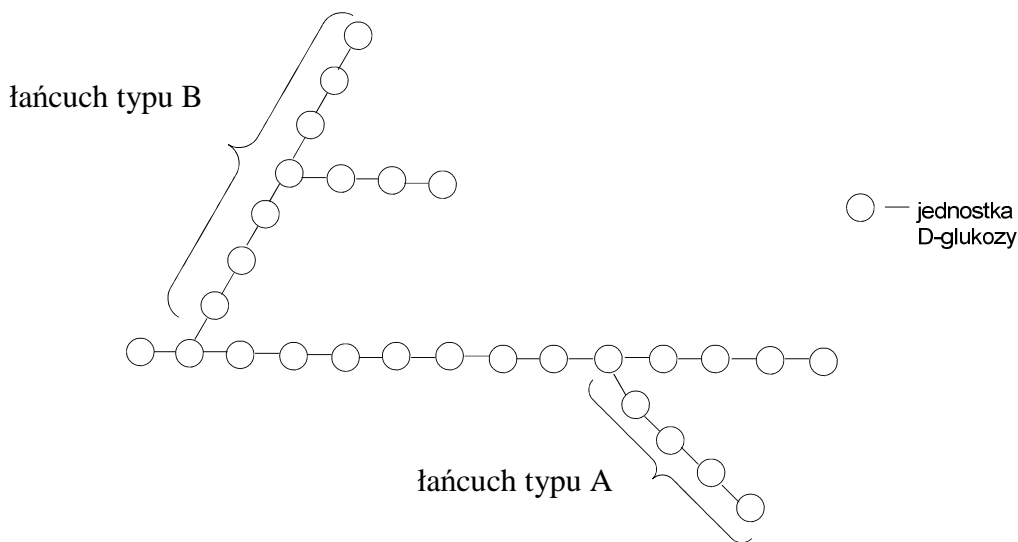
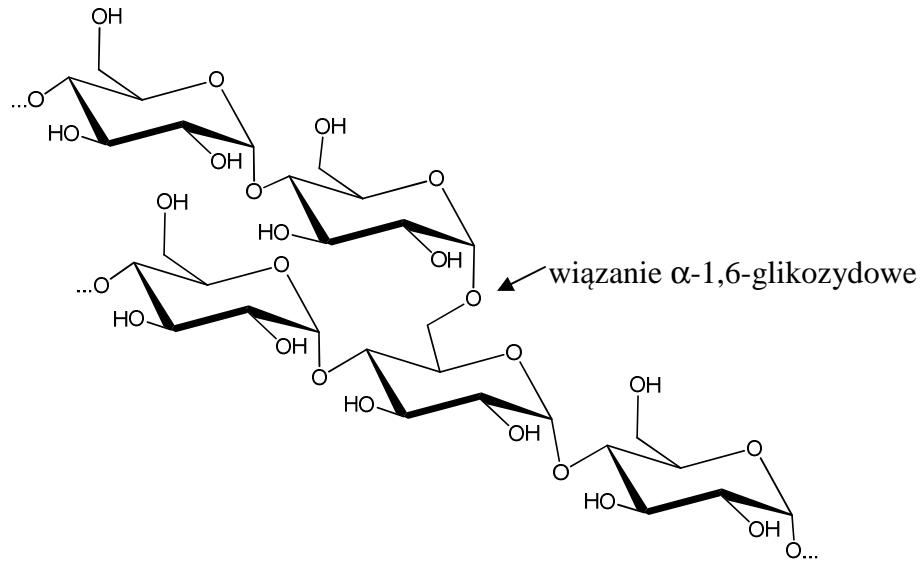
Schemat budowy amylozy

W rzeczywistości jest to mieszanina liniowych i bardzo słabo rozgałęzionych łańcuchów glukanowych. Łańcuchy amylozy występują w formie lewoskrętnej helisy (każdy zwój takiej helisy zawiera 6 reszt D-glukozy), stabilizowanej wiązaniami wodorowymi wewnątrz której może ulegać wiązaniu jod dając w efekcie skrobi charakterystyczne ciemnoniebieskie zabarwienie. Kilka nici amylozy (6 lub 7) może łączyć się w tzw. „wiązki” tworzące coś na kształt rury z kanałem w środku. Zwykle skrobia pochodząca z ziaren zbóż w wiązce zbudowanej z sześciu helis zawiera siódmą helisę w środku. Z kolei w skrobi ziemniaczanej wiązki amylozy złożone są z 6 helis i w środku mają pustą przestrzeń zdolną do inkludowania mniejszych cząstek.

Amylopektyna jest tworem rozgałęzionym, w którym łańcuch centralny tworzą cząsteczki D-glukozy połączone wiązaniem α -1,4-glikozydowym, od którego odchodzą liczne odgałęzienia tworzone przez wiązania α -1,6-glikozydowe. Dla przykładu, w skrobi ziemniaczanej wiązania α -1,6-glikozydowe stanowią około 4% wszystkich wiązań glikozydowych obecnych w polimerze. Dzięki obecności tych wiązań jednym z produktów

hydrolizy amylopektyny jest izomaltoza. Długość łańcuchów bocznych jest zróżnicowana i średnio wynosi od 13 do 45 reszt glukozowych (mogą jednak występować znacznie dłuższe łańcuchy boczne). Wśród łańcuchów bocznych wyróżnia się tzw. łańcuchy typu A (nie posiadające dalszych odgałęzień) oraz łańcuchy typu B (z co najmniej jednym bocznym odgałęzieniem). Masa cząsteczkowa amylopektyny jest znacznie większa niż amylozy i przekracza 500 kDa, a sięga nawet do 100000 kDa.

Cechą charakterystyczną dla skrobi ziemniaczanej jest występowanie pewnej ilości (około 0.081%) „ufosforylowanych” reszt glukozowych (występujące głównie w amylopektynie pierwszorzędowe grupy OH zestryfikowane kwasem fosforowym).



Schemat budowy amylopektyny

Skrobia występuje w ziemniakach, ziarnie zbóż i w owocach, pestkach, bulwach oraz kłączach 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 przeciętne zawartości amylozy w zależności od źródła skrobi.

Źródło	Zawartość amylozy [%]
Kukurydza woskowa	1
Ziarna zbóż	~20
Ziemniaki	30
Groch	70
Kukurydza wysokoamylozowa	85

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.

Skrobia znalazła różnorodne zastosowania, szczególnie w przemyśle spożywczym. Wykorzystuje się ją głównie do produkcji syropów maltodekstrynowych, maltozowych, glukozowych i fruktozowych. Poszczególne syropy różnią się stopniem hydrolizy skrobi i najczęściej charakteryzuje się je poprzez tzw. ekwiwalent dekstrozowy DE (ang. dextrose equivalent). Ekwiwalent ten wyrażony jest w procentowej zawartości cukrów redukujących (zwykle równoważników glukozy) na jednostkę suchej masy produktów. Zwykle się przyjmuje, że dla skrobi DE jest w przybliżeniu równy zero, podczas gdy przeprowadziłoby się pełną hydrolizę skrobi do glukozy DE wynosiłoby 100.

Syropy maltodekstrynowe powstają w wyniku tzw. „upłynniania skrobi”. Stosuje się je jako regulatory wilgotności przetworów spożywczych, zagęszczacze, inhibitory krystalizacji, nośniki leków, wypełniacze lub plastyfikatory żywności. Syropy maltozowe lub glukozowe uzyskuje się w tzw. procesie „scukrzania skrobi” po jej uprzednim upłynnieniu.

Syropy maltozowe stosuje się głównie w przemyśle cukierniczym do zapobiegania krystalizacji sacharozy, polepszania konsystencji przetworów spożywczych i przedłużania ich trwałości. Syropy o dużej zawartości maltozy stosuje się do produkcji lodów, mrożonej żywności (ograniczają powstawanie kryształków lodu), napojów bezalkoholowych oraz żywności dla diabetyków. Syropy powstałe ze skrobi stosuje się też jako substytuty tłuszczów w żywności „fat free”.

Syropy glukozowe znajdują głównie zastosowanie w przemyśle browarniczym, gorzelniczym oraz piekarniczym. Otrzymuje się z nich również syropy fruktozowe dodawane do konfitur, syropów i napojów takich jak Pepsi, Mirinda, Coca Cola. Syropów fruktozowych używa się również do produkcji żywności dla diabetyków.

Początkowo, na przełomie XIX i XX wieku otrzymywano już znaczące ilości syropów skrobiowych z zastosowaniem kwasów nieorganicznych do przeprowadzania hydrolizy kwasowej skrobi. Po odkryciu enzymów amylolitycznych i opracowaniu sposobów ich pozyskiwania zaczęto stosować metodę mieszaną hydrolizy skrobi (hydrolizę kwasową połączoną z hydrolizą enzymatyczną). Pod koniec XX wieku stosowano już właściwie enzymatyczne metody hydrolizy skrobi.

Enzymy stosowane do hydrolizy skrobi są zaliczane do podklasy hydrolaz (EC 3.2.). W roztworach wodnych katalizują one przede wszystkim hydrolizę wiązań glikozydowych, ale

przy dużych stężeniach cukrów mogą katalizować również reakcje odwrotne: kondensacji, a także reakcje transglukozytacji.

Typowymi enzymami trawiennymi, występującymi w ślinie i wydzielinie trzustki kręgowców są amylazy, które katalizują rozkład skrobi i glikogenu. 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 siodu. W procesach technologicznych amylazy pochodzenia roślinnego i zwierzęcego zostały stopniowo zastąpione przez tańsze enzymy grzybowe i bakteryjne.

Znane są różne rodzaje amylaz, a podzielić je można w wieloraki sposób. Z punktu widzenia możliwości hydrolizy różnych wiązań glikozydowych można je sklasyfikować na atakujące wiązania α -1,4-glikozydowe (α -amylazy, β -amylazy), atakujące wiązania α -1,6-glikozydowe (izoamylazy i pululanazy) oraz hydrolizujące wiązania α -1,4-glikozydowe i α -1,6-glikozydowe (glukoamylazy i niektóre pululanazy).

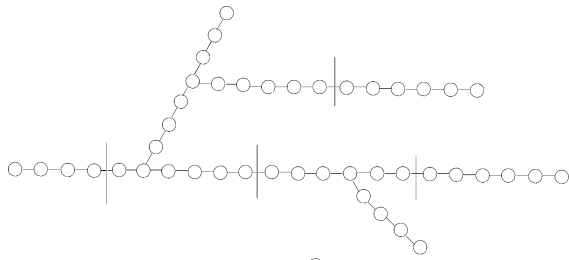
Biorąc pod uwagę miejsce cięcia wiązania glikozydowego w cząsteczce skrobi można je podzielić na endoamylazy (α -amylazy, amylazy znoszące rozgałęzienia) oraz egzoamylazy (glukoamylazy i β -amylazy).

Z punktu widzenia zachodzących procesów możemy je podzielić na enzymy upłynniające (α -amylazy, izoamylazy, pululanazy) i scukrzające (β -amylazy, glukoamylazy i niektóre α -amylazy).

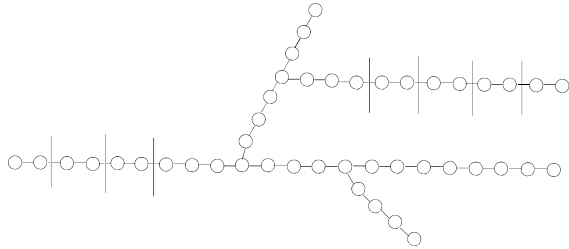
Amylazy można też podzielić z punktu widzenia źródeł ich pochodzenia, a także z punktu widzenia konfiguracji centrum anomerycznego uwalnianych produktów hydrolizy.

Widać więc, że omawiana podklasa enzymów jest bardzo różnorodna. Spośród licznych znanych amylaz głównymi są: α -amylaza zaliczana do endoamylaz oraz β -amylaza i glukoamylaza zaliczane do grupy egzoamylaz. Wszystkie katalizują hydrolizę wiązań 1-4- α -glikozydowych, a zgodnie z nazwą endoamylazy, α -amylaza atakuje wiązania znajdujące się wewnątrz łańcucha (prowadząc do upłynniania skrobi i powstawania oligosacharydów), natomiast β -amylaza i glukoamylaza, jako egzoamylazy, rozrywają odpowiednio co drugie (β -amylaza) lub kolejne (glukoamylaza) wiązania glikozydowe, poczynając od nieredukującego końca łańcucha.

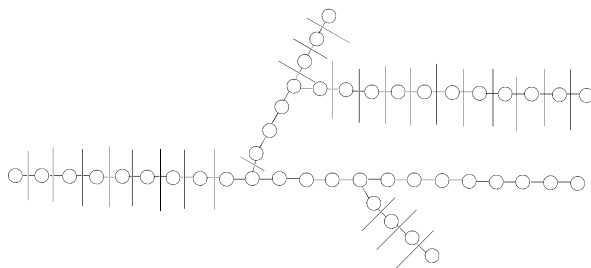
Skrobia obok stosunkowo prostej do zhydrolizowania frakcji amylozy zawiera również frakcję amylopektyny złożoną z łańcuchów rozgałęzionych. Ponieważ wiązania α -1,6-glikozydowe, występujące przy rozgałęzieniach w amylopektynie, stanowią barierę dla działania β -amylazy, rozkład tej frakcji skrobi jest inny: boczne łańcuchy są rozkładane przez β -amylazę do maltozy, podobnie jak prosty łańcuch amylozy, po czym reakcja zatrzymuje się w odległości trzech jednostek glukozy od miejsca rozgałęzienia (wiązania α -1,6-glikozydowego). 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 jest w stanie „przeskakiwać” przez wiązania α -1,6-glikozydowe (bez ich hydrolizy), tworząc nowe, proste łańcuchy, które mogą już być dalej 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-1,6-glukozy, oraz niewielkiej ilości wolnej glukozy.



degradacja skrobi przez α -amylazę



degradacja skrobi przez β -amylazę



degradacja skrobi z udziałem glucoamylaz

Najlepiej radzi sobie z amylopektyną (i glikogenem) glucoamylaza występująca w grzybach oraz u zwierząt. Rozkłada ona zarówno wiązania α -1,4- jak i α -1,6-glikozydowe (o ile te ostatnie znajdują się przy nieredukującej jednostce glukozy) i dlatego przy jej udziale amylopektyna i glikogen ulegają rozkładowi do glukozy.

Zarówno sok jelitowy, jak i ziarna zbóż zawierają również α -1,4-glikozydazę i α -1,6-glikozydazę (izomaltazę). Enzymy te rozkładają wytworzone w wyniku działania β -amylazy disacharydy do cząsteczek glukozy, która jest końcowym produktem rozkładu enzymatycznego skrobi.

Nazwa	EC	Typ hydrolizowanych wiązań
α -amylazy	EC 3.2.1.1	α -1,4-glikozydowe
β -amylazy	EC 3.2.1.2	α -1,4-glikozydowe
glucoamylazy	EC 3.2.1.3	α -1,4- i α -1,6-glikozydowe
pululanazy	EC 3.2.1.41	α -1,6-glikozydowe
izoamylazy	EC 3.2.1.68	α -1,6-glikozydowe

Większość amylaz do osiągnięcia aktywności wymaga obecności jonów wapnia. Należy również pamiętać, że amylazy różnią się między sobą wartością optymalnego pH oraz temperatury przy których wykazują maksymalną aktywność.

PRZEBIEG ĆWICZENIA

Oznaczanie aktywności amylazy metodą Heinkela

Odczynniki:

- ♦ preparat enzymatyczny
- ♦ substrat skrobiowy: 0.5g skrobi rozpuszczalnej, 1g NaCl i 2g cytrynianu sodu rozpuścić w 80 ml wody ogrzewając do wrzenia. Dodać 1g benzoesu sodu dla konserwacji i uzupełnić wodą do 100 ml;
- ♦ 0.9% roztwór NaCl;
- ♦ 20% roztwór wodny kwasu sulfosalicylowego;
- ♦ roztwór jodu: 2g KI rozpuścić w 5 ml wody i w tym roztworze rozpuścić 1g jodu, po czym uzupełnić wodą do 300 ml. 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 odpowiednio 2, 4, 6 i 8 ml i uzupełniając wodą do 10 ml.

Szkló i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- ♦ statyw z probówkami
- ♦ pipety szklane
- ♦ lejki
- ♦ kolbki miarowe
- ♦ fiołki z korkami
- ♦ sączi karbowane
- ♦ spektrofotometr, kuweta spektrofotometryczna
- ♦ łaźnia wodna
- ♦ waga analityczna

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 umieścić w probówce i ogrzać do 37°C przez wstawienie do łaźni na 10 minut, następnie wprowadzić 0.1 ml preparatu enzymatycznego. Inkubować w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 30 minut. Po tym czasie dodać 2.5 ml roztworu kwasu sulfosalicylowego i umieścić probówkę w łaźni ultradźwiękowej. Po 5 minutach przesączyć roztwór do probówki.

Równolegle wykonać próbę kontrolną biorąc 0.1 ml preparatu enzymatycznego, 2.5 ml roztworu kwasu sulfosalicylowego i umieszczając probówkę na 5 minut w łaźni ultradźwiękowej. Następnie do probówki dodać (bez inkubacji) 2.4 ml substratu. Przesączyć analogicznie jak poprzednią próbkę do kolejnej probówki.

Do 0.5 ml przesącza próby badanej i kontrolnej (w dwóch kolejnych probówkach) wprowadzić 9.5 ml rozcieńzonego 150-krotnie roztworu jodu i całość dokładnie wymieszać. 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 probówek zawierających 0.1 ml roztworów wzorcowych zawierających odpowiednio 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 rozcieńzonego 150-krotnie roztworu jodu. Zawartość probówek dokładnie wymieszać, a następnie 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. Wohlgemutha w surowicy, do 40 j. Wohlgemutha w moczu, a w soku trzustkowym 500-1500 j. Wohlgemutha.

Enzymatyczna degradacja skrobi

Odczynniki:

- ♦ preparat enzymatyczny
- ♦ skrobia kukurydziana lub ziemniaczana

Szkló i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- ♦ kolby stożkowe na 250 ml
- ♦ pipety
- ♦ wata
- ♦ sączi karbowane
- ♦ lejki
- ♦ cylindry
- ♦ kolby okrągłodenne na 250 ml
- ♦ mieszadło
- ♦ papierki wskaźnikowe
- ♦ waga analityczna
- ♦ cieplarka
- ♦ wyparka rotacyjna

Wykonanie ćwiczenia:

Hydroliza skrobi:

W kolbie stożkowej o pojemności 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 jeszcze 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 określoną przez prowadzącego ćwiczenie temperaturę i pozostawić na 24-72h. Następnie zawartość kolbki ogrzać do wrzenia w celu zdenaturowania enzymu, po

ochłodzeniu przesączyć, 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 zatężyć w zważonej kolbie okrągłodennej na wyparce rotacyjnej i określić masę pozostałości.

Oznaczanie cukrów redukujących metodą Somogyi

Odczynniki:

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

Roztwory A, B i C połączyć ze sobą, dodać 4g jodku potasu oraz 0.6g 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 15g 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.

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- ♦ kolby stożkowe o pojemności 100 ml z szeroką szyją
- ♦ pipety
- ♦ lejki
- ♦ biureta
- ♦ wrząca łaźnia wodna
- ♦ waga analityczna.

Wykonanie ćwiczenia:

Po zmierzeniu całkowitej objętości hydrolizatu (i zapisaniu tej wartości) pobrać po dwie próbki hydrolizatu (po 0.5 ml każda) do dwóch kolb stożkowych na 100 ml. Do każdej kolby stożkowej 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 kolbek 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 zatężeniu przesączy. Przeanalizować uzyskane wyniki i wyjaśnić ewentualne różnice pomiędzy masą uzyskaną z obliczeń i masą uzyskaną w wyniku zatężania.

PRZYGOTOWANIE DO ZAJĘĆ

1. Przeczytaj uważnie instrukcję i dokładnie przeanalizuj czynności oraz techniki laboratoryjne opisane w części eksperymentalnej.
2. Zapoznaj się z zagrożeniami związanymi z stosowanymi odczynnikami oraz poszczególnymi czynnościami wykonywanymi na zajęciach (karty charakterystyk)
2. Zwróć uwagę czy znasz następujące pojęcia: homopolimer, wiązanie α -glikozydowe, amylazy, cukry redukujące
3. Zastanów się czy wiesz:
 - a) gdzie występuje skrobia i jak jest zbudowana (różnice w budowie amylozy i amylopektyny)
 - b) jaki jest podział amylaz ze względu na mechanizm hydrolizy łańcuchów skrobi,
 - c) jakie jest zastosowanie skrobi w przemyśle.
 - d) na czym bazuje oznaczenie spektrofotometryczne aktywności enzymu (w jaki sposób tworzy się barwny kompleks skrobi z jodem)

OPRACOWANIE WYNIKÓW

W sprawozdaniu nie umieszczać wstępu teoretycznego.

Sprawozdanie powinno obejmować opis przebiegu hydrolizy skrobi (z uwzględnieniem masy i rodzaju wziętego do hydrolizy substratu, dokładnego postępowania przy upłynnianiu, rodzaju zastosowanego enzymu, czasu i temperatury hydrolizy, sposobu przerywania reakcji, ilości przesączy po hydrolizie z dokładnością do 0.5 ml oraz masy uzyskanego po zatężeniu produktu oraz opisu jego wyglądu).

Kolejny punkt sprawozdania powinien zawierać opis przebiegu oznaczania aktywności enzymu wraz z dokładnym podaniem jego nazwy handlowej, w tabeli powinny być zestawione uzyskane wyniki pomiaru absorpcji zarówno dla próbek z enzymem, jak i dla próbek do krzywej wzorcowej. Na podstawie uzyskanych wyników pomiarów należy sporządzić odpowiedni wykres w Excelu, który również dołącza się do sprawozdania. Na jego podstawie odczytuje się aktywność enzymu.

W ostatnim punkcie sprawozdania należy opisać postępowanie przy oznaczaniu cukrów redukujących. Wyniki zebrać w tabeli, na ich podstawie przygotować wykres w Excelu i z otrzymanego równania wyznaczyć zawartość cukrów redukujących w oznaczanych 0.5ml próbkach hydrolizatu.

Następnie należy przeliczyć zawartość cukrów redukujących dla całej objętości hydrolizatu (np. w 0.5 ml hydrolizatu oznaczono 6 mg cukrów redukujących, całkowita objętość

przesączu hydrolizatu wynosiła 50 ml (100 razy więcej niż objętość oznaczanej próbki) więc w sumie jest $100 \cdot 6$ mg, czyli 600 mg cukrów redukujących).

Na zakończenie porównać ilość produktu hydrolizy skrobi uzyskanego w wyniku zatężenia hydrolizatu z ilością produktu wyliczoną na podstawie oznaczenia cukrów redukujących. W przypadku istotnych różnic w obu masach wyjaśnić, co mogło spowodować te różnice.

W całym sprawozdaniu należy zwracać uwagę aby opis dotyczył faktycznego !!! przebiegu ćwiczenia i nie był „kalką” instrukcji.

Sprawozdanie należy oddać prowadzącemu najpóźniej w dwa tygodnie po zakończeniu ćwiczenia. Późniejsze oddanie sprawozdania powoduje obniżenie oceny zgodnie z zasadami przedstawionymi na zajęciach organizacyjnych.

LITERATURA

- J. Bryjak, *Biotechnologia*, 1 (44) (1999) 180-225.
- J. Kączkowski, *Podstawy biochemii*, WNT, Warszawa, (1993) 284-293.
- A. Kołodziejczyk, *Naturalne związki organiczne*, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, (2004) 278-285.
- L. Kłyszajko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z Biochemii*, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, (2003) 280-281, 562-564.
- R. L. Whistler, M. L. Wolfrom, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. I, Academic Press Inc. NY and London, (1962) 383-386.