

ROZDZIAŁ XIV. **AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW
AMYLOLITYCZNYCH
W PRZECHOWYWANYCH
ORGANACH SPICHRZOWYCH**

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Ziemniak jest obok zbóż jedną z podstawowych roślin wykorzystywanych w żywieniu ludzi i zwierząt. Jest też ważnym produktem dla przemysłu spożywczego (frytki, chipsy, krochmal, alkohol etylowy itp.). Znaczenie spożywcze i paszowe ziemniaka wiąże się głównie z dużą zawartością skrobi, która w zależności od gatunku stanowi 15–30% w przeliczeniu na świeżą masę. Bulwy ziemniaka są też dobrym źródłem witaminy C oraz makro- i mikroelementów niezbędnych dla prawidłowego rozwoju organizmu człowieka. Popiół stanowi zwykle 3,8% suchej masy i w przeliczeniu na 100 części popiołu zawiera: K_2O – 60,1, Na_2O – 2,9, CaO – 2,6, MgO – 4,9, Fe_2O_3 – 1,1, P_2O_5 – 16,9, SO_2 – 6,5, SiO_2 – 2,0, Cl (w chlorkach nieorganicznych) – 3,0.

Ziarna skrobi w bulwach ziemniaka, tzw. skrobianki, zlokalizowane w amyloplastach są zwykle dużymi pojedynczymi tworami, z wewnętrznym układem warstw rozmieszczonych ekscentrycznie. Warstwy te powstają najprawdopodobniej w wyniku nierównomiernego uwodnienia skrobi w poszczególnych okresach tworzenia się skrobianki.

Skrobia jest homoglikanem $(C_6H_{10}O_5)_n$ zbudowanym z cząsteczek α -D-glukozy. W plastydach występuje w postaci amylozy, gdzie cząsteczki glukozy połączone są wiązaniem glikozydowym między atomami 1 i 4 sąsiadujących ze sobą cząsteczek i amylopektyny, w której średnio co 12–20 reszt glukozydowych występuje połączenie typu glikozydowego 1–6, w wyniku czego amylopektyna ma strukturę rozgałęzioną. Amyloza zbudowana jest z kilkuset lub kilku tysięcy reszt glukozydowych (najczęściej 300–2000), a amylopektyna z kilku–kilkunastu tysięcy reszt (najczęściej 1200–6000). Testem różnicującym formy skrobi jest test rozpuszczalności w wodzie w temperaturze 70–80°C, w takich warunkach rozpuszczeniu ulega tylko amyloza. W bulwach

ziemniaka około $\frac{3}{4}$ skrobi występuje w formie amylopektyny, a tylko $\frac{1}{4}$ w formie amylozy. Skrobia powstająca w tkankach fotosyntetyzujących rozkładana jest na drodze fosforolizy przy udziale fosforylasy α -glukanowej, β - i α -amylaz oraz cząsteczki wody. Kluczowym etapem fosforolizy jest reakcja katalizowana przez fosforylase α -glukanową, która odcina od łańcucha skrobiowego resztę glukozy i przyłącza do niej fosforan nieorganiczny. Reakcja prowadzi do utworzenia glukozo-1-fosforanu, który wchodzi w dalsze przemiany. Jednocześnie następuje skrócenie łańcucha skrobi o 1 cząsteczkę glukozy.

Wzrost stężenia cukrów redukujących w czasie przechowywania warzyw i owoców jest jednym z ważniejszych problemów przemysłu spożywczego. Obecna w tkankach roślinnych oksydaza polifenolowa katalizuje hydroksylację monofenoli do *o*-difenoli, które z kolei utlenia do *o*-chinonów. *o*-chinony spontanicznie kondensują z wieloma innymi związkami, w tym z cukrami redukującymi, w wyniku czego tworzą się wysokocząsteczkowe polimery, nadające tkankom charakterystyczne brązowe zabarwienie i powodujące obniżenie walorów wzrokowych oraz smakowych.

Ponieważ w przemianach skrobi w cukry niskocząsteczkowe uczestniczą enzymy zlokalizowane w błonach amyloplastów, wzrost stężenia cukrów redukujących jest wynikiem zaburzeń struktur komórkowych. Spadek temperatury, w której przechowywane są bulwy do 0–2°C, wywołuje wzrost przepuszczalności błon komórkowych, czego efektem jest przesunięcie równowagi w kierunku tworzenia się cukrów redukujących. Przyczynami szybkiego fizjologicznego starzenia się ziemniaka są też wysoka temperatura w czasie długotrwałego przechowywania i znaczna dojrzałość bulw, powodująca dużą intensywność ich kielkowania. Wywołuje to nieodwracalne zmiany w składzie lipidowym błon komórkowych, w wyniku czego wzrasta ich przepuszczalność, powodując akumulację cukrów redukujących w organie. Jest to zjawisko tzw. słodkości starczej (ang. *senescent sweetening*).

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

Zapoznanie ze zmianami metabolizmu cukrów i białek organów spichrzowych w zależności od warunków ich przechowywania oraz określenie ich przydatności użytkowej.

Materiał

bulwy ziemniaka jednego gatunku przechowywane w różnych warunkach temperaturowych (chłódnia, temperatura pokojowa, 37°C) i oświetlenia (ciemność, światło) przez okres jednego i trzech miesięcy

Doświadczenie I

Oznaczanie aktywności α -amylazy

Zasada metody

α -amylaza hydrolizuje skrobię do produktu niedającego reakcji barwnej z jodem. Skrobię, która uległa hydrolizie, oznacza się kolorymetrycznie za pomocą reakcji barwnej z jodem.

Odczynniki

- a) odczynnik skrobiowy: 0,5 g skrobi, 1g NaCl i 2 g cytrynianu sodu rozpuścić w 80 cm³ wody destylowanej i zagotować (2–3 minuty), po ostygnięciu uzupełnić do 100 cm³ wodą destylowaną
- b) odczynnik Gramma: 1,67 g KI rozpuścić w niewielkiej ilości wody destylowanej, dodać 0,83 g jodu metalicznego, następnie przenieść do kolby miarowej o pojemności 250 cm³ i uzupełnić do 250 cm³ wodą destylowaną

Sprzęt laboratoryjny

wirówka, spektrofotometr, kuwety spektrofotometryczne, cieplarnia 37°C, probówki szklane chemiczne, probówki wirownicze, pipety (0,1–10 cm³), gaza, szalki Petriego (duże), nóż, drobna tarka do warzyw

Wykonanie doświadczenia

1. Przygotowanie ekstraktu z bulw ziemniaka

Ziemniaki obrać (bardzo cienko), opłukać pod bieżącą wodą i zetrzeć na tarce. Uzyskaną w ten sposób pulpę przesączyć do probówek wirowniczych przez poczwórną warstwę gazy. Materiał odwirować ($5000 \times g$, 10 min) w celu usunięcia całych ziaren skrobi. Do dalszych badań używać supernatantu.

2. Oznaczanie aktywności α -amylazy

Oznaczenie przeprowadzić w probówkach chemicznych. Do $2,5 \text{ cm}^3$ odczynnika skrobiowego dodać $0,1 \text{ cm}^3$ próby badanej (supernatant) i mieszaninę inkubować 30 minut w temperaturze 37°C . Natychmiast po zakończeniu inkubacji przenieść po $0,25 \text{ cm}^3$ inkubatu do wcześniej przygotowanych probówek zawierających po $9,5 \text{ cm}^3$ wody destylowanej i $0,1 \text{ cm}^3$ odczynnika Gramma. Obydwa odczynniki przed dodaniem inkubatu dobrze wymieszać. Próbką odczynnikową (kontrola) jest inkubat odczynnika skrobiowego z wodą destylowaną zmieszane w identycznej proporcji jak próby badane i $0,1 \text{ cm}^3$ odczynnika Gramma. Pomiaru absorbancji dokonać w kuwetach spektrofotometrycznych przy długości fali 560 nm względem wody destylowanej w ciągu 5 minut.

Opracowanie wyników

Do obliczania aktywności α -amylazy w jednostkach Wohlgemutha [j. W.] zastosować wzór:

$$\text{Aktywność [j. W.]} = \frac{(Abs_{po} - Abs_{pb})}{Abs_{po}} \times 200$$

gdzie:

j. W. – jednostka Wohlgemutha, czyli ilość α -amylazy, która w czasie 30 minut w temperaturze 37°C hydrolizuje 1 mg skrobi,

Abs_{pb} – absorbancja próby badanej,

Abs_{po} – absorbancja próby odczynnikowej,

200 – stała Wohlgemutha, współczynnik przeliczeniowy do uzyskania [j. W.].

Doświadczenie II

Oznaczanie stężenia cukrów redukujących metodą Nelsona

Zasada metody

Cukry redukujące zawarte w próbie badanej powodują w czasie gotowania wypadanie z roztworów zawierających miedź dwuwartościową ceglastego osadu Cu_2O . Tlenek miedzi (I) rozpuszcza się w odczynniku arseno-molibdenowym, dając niebieskie zabarwienie.

Odczynniki

- a) odczynnik miedziowy I: w 600 cm³ wrzącej wody destylowanej rozpuścić 200 g Na_2SO_4 . Oddzielnie w 100 cm³ wody destylowanej rozpuścić 25 g winianu sodowo-potasowego. Obydwa roztwory przenieść do litrowej kolby, dodać do nich 20 g NaHCO_3 , 25 g bezwodnego Na_2CO_3 i ostatecznie uzupełnić do 1 dm³ wodą destylowaną. Jeśli uzyskany roztwór jest mętny, należy go przesączyć. Roztwór przechowywać w 37°C
- b) odczynnik miedziowy II: 15% roztwór $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ z dodatkiem 1–2 kropli stężonego H_2SO_4
- c) mieszanina odczynników miedziowych I i II w stosunku 25:1. Sporządzić bezpośrednio przed użyciem
- d) odczynnik arseno-molibdenowy: w 450 cm³ wody destylowanej rozpuścić 25 g molibdenianu amonowego, dodać 31 cm³ stężonego H_2SO_4 . W 25 cm³ wody destylowanej rozpuścić 3 g arsenianu sodowego ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Obydwa roztwory zmieszać i inkubować 24–48 godzin w temperaturze 37°C (lub ogrzewać przez 25 minut w temperaturze 55°C). Roztwór o żółtym zabarwieniu przechowywać w ciemnej butelce – odczynnik trwały
- e) 500 mg% roztwór wzorcowy glukozy (wykonać przed rozpoczęciem oznaczeń)

Sprzęt laboratoryjny

probówki szklane chemiczne, pipety (0,1–5 cm³), spektrofotometr, kuwety spektrofotometryczne

Wykonanie doświadczenia

Do probówki dodać 0,1 cm³ 20-krotnie rozcieńczonej próby badanej, 0,4 cm³ wody destylowanej i 0,4 cm³ odczynnika c (mieszanina

odczynników miedziowych). Zawartość próbówki dokładnie wymieszać i gotować w łaźni wodnej przez 20 minut. Po tym czasie próbki schłodzić pod bieżącą wodą i dodać $0,4 \text{ cm}^3$ odczynnika arseno-molibdenowego oraz $2,8 \text{ cm}^3$ wody destylowanej. Wartość absorbancji zmierzyć w kuwetach spektrofotometrycznych przy długości fali 660 nm wobec próby kontrolnej wykonanej w ten sam sposób jak próba badana z użyciem $0,5 \text{ cm}^3$ wody destylowanej. Jednocześnie z próbą badaną wykonać krzywą kalibracyjną w zakresie 10–200 mg% (10, 50, 100, 150 i 200 mg%).

Opracowanie wyników

Stężenie cukrów redukujących odczytać z krzywej kalibracyjnej.

UWAGA: Do oznaczenia stężenia glukozy można wykorzystać powszechnie stosowane w laboratoriach analitycznych zestawy odczynnikowe (zgodnie z metodyką opisaną przez producenta).

Doświadczenie III

Oznaczanie stężenia białka metodą biuretową

Zasada metody

Zawarte w próbce badanej białko wchodzi w reakcję biuretową ze składnikami odczynnika. Odczynnik biuretowy reaguje z wiązaniami peptydowymi $-\text{CO}-\text{NH}-$, które łączą aminokwasy w łańcuchu polipeptydowym.

Odczynniki

- a) odczynnik biuretowy: $1,5 \text{ g CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ i 6 g winianu sodowo-potasowego rozpuścić w 300 cm^3 wody destylowanej, następnie dodać 300 cm^3 10% NaOH i 2 g KI. Po dokładnym rozpuszczeniu wszystkich składników uzupełnić roztwór wodą destylowaną do 1000 cm^3 . Odczynnik przechowywać w ciemnej butelce – odczynnik trwały
- b) roztwór wzorcowy albuminy o stężeniu 10 mg% (wykonać 24 godziny przed użyciem)

Sprzęt laboratoryjny

probówki szklane, pipety (0,1–5 cm³), spektrofotometr, kuwety spektrofotometryczne

Wykonanie doświadczenia

Do probówki dodać 0,5 cm³ próby badanej, 0,5 cm³ wody destylowanej i 5 cm³ odczynnika biuretowego. Po dokładnym wymieszaniu probówki odstawić do ciemnego miejsca na 30 minut. Dokładnie po tym czasie zmierzyć wartość absorbancji w kuwecie spektrofotometrycznej przy długości fali 530 nm wobec próby odczynnikowej (kontrola) wykonanej identycznie jak próby badane, ale zawierającej 1 cm³ wody destylowanej.

Opracowanie wyników

Wartość stężenia białka odczytać z krzywej wzorcowej wykonanej dla albuminy w zakresie 1–10 mg% (1, 2, 5, 7 i 10 mg%).

Zinterpretować wszystkie uzyskane wyniki dotyczące aktywności α -amylazy, stężenia cukrów redukujących i białka.

UWAGA: Do oznaczenia stężenia białka można wykorzystać również metodę Bradford.

Literatura

- Berg J. M., Stryer L., Tymoczko J. L., Gatto G. J., *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
- Kączkowski J., *Podstawy biochemii*, Wydawnictwo WNT, Warszawa 2019.
- Kłyszewko-Stefanowicz L. (red.), *Ćwiczenia z biochemii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
- Kopcewicz J., Lewak S. (red.), *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.