

5. Badanie rozkładu skrobi przez amylazę

Skrobia jest roślinnym polisacharydem zbudowanym z cząsteczek D-glukozy. Dla zwierząt jest ona podstawowym źródłem węglowodanów w pożywieniu. Skrobia jest w rzeczywistości mieszaniną dwóch polisacharydów: nierozgałęzionej, liniowej amylozy, oraz rozgałęzionej amylopektyny. Amyloza zbudowana jest z monomerów D-glukozy połączonych wiązaniami α -1,4-glikozydowymi. Rozgałęzienia w amylopektynie wynikają z obecności wiązań α -1,6-glikozydowych. Ludzka α -amylaza (EC 3.2.1.1) jest jednym z głównym enzymów trawiennych. Jest to glikoproteina o masie cząsteczkowej wynoszącej około 57,6 kDa, zbudowana z 512 reszt aminokwasowych oraz pojedynczego łańcucha oligosacharydowego. Jej centrum aktywne stabilizowane jest jonem Ca^{2+} . α -Amylaza wydzielana jest przez gruczoły ślinowe i trzustkę. Jej rolą jest hydroliza wiązań α -1,4-glikozydowych łączących cząsteczki D-glukozy w polisacharydach, takich jak: skrobia i glikogen. Produktami działania α -amylazy są disacharydy (maltoza), trisacharydy (maltotrioza) oraz większe rozgałęzione oligosacharydy złożone z 6-8 monomerów glukozy. Powstanie tych ostatnich produktów wynika z faktu, że α -amylaza nie hydrolizuje obecnych w amylopektynie wiązań α -1,6-glikozydowych. Dalszą hydrolizę di- i oligosacharydów, mającą na celu utworzenie dostępnych dla komórek cząsteczek D-glukozy, prowadzą inne enzymy glikolityczne, takie jak maltaza i izomaltaza. Różnica w składzie aminokwasowym amylazy ślinowej i trzustkowej jest niewielka – jednorodność wynosi aż 97%.

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny.

1. Roztwór podstawowy α -amylazy gorzelniczej o stężeniu 15 mg/15 mL wody (dla pięciu par)
2. Świeżo sporządzony wodny roztwór skrobi
3. 5 mM wodny roztwór jodu w jodku potasu (30g/L)
4. 0,5 M roztwór HCl
5. Bufor McIlvaina pH 3; 5; 7,5
6. Probówki szklane
7. Probówki typu Falcon
8. Spektrofotometr UV-VIS
9. Kuwety plastikowe

1. Przyrządzenie wodnego roztworu skrobi

Do 0,6 g skrobi (w kolbie stożkowej) dodać 10 mL zimnej wody. Następnie dodać 30 mL gorącej wody (**roztwór musi być klarowny**). Otrzymany roztwór skrobi przechowywać w temperaturze 37 °C przez cały czas trwania ćwiczenia.

2. Rozkład skrobi pod wpływem α -amylazy gorzelniczej

Do 14 probówek szklanych dodać po 0,15 mL roztworu jodu w jodku potasu oraz po 0,5 mL 0,5 M roztworu HCl. Do probówki nr 1 dodać 1 mL wody. Do probówki nr 2 dodać 1 mL 1% roztworu skrobi. Obie probówki posłużą jako odnośniki podczas całego ćwiczenia.

2.1 Rozkład w pH 7,5

Do probówki Falcon odmierzyć 1 mL roztworu podstawowego α -amylazy i 9 mL buforu o pH 7,5. Probówkę ogrzewać w temperaturze 37 °C przez 10 minut. Następnie dodać 10 mL roztworu skrobi. Natychmiast po tej czynności, pobrać 1 mL mieszaniny enzymu i skrobi i dodać do probówki nr 3 zawierającej roztwór jodu w jodku potasu oraz roztwór HCl. **UWAGA** - probówkę Falcon z mieszaniną enzymu i skrobi trzymać między pobraniami w temperaturze 37 °C. Kolejne porcje mieszaniny enzymu i skrobi (1 mL) pobierać po: 2, 4, 12 i 20 minutach. Obserwować zmiany barwy roztworów. Na koniec wykonać pomiary wartości absorbancji za pomocą czytnika płytek lub spektrofotometru UV-VIS przy długości fali 492 nm lub 500 nm. W tym drugim przypadku, kuwetę odnośnikową wypełnić roztworem z probówki nr 1. Sporządzić wykres obrazujący rozkład skrobi w czasie (min).

2.2 Rozkład w pH 5

Do probówki Falcon odmierzyć 1 mL roztworu podstawowego α -amylazy gorzelniczej i 9 mL buforu o pH 5. Dalsze czynności wykonać analogicznie jak w punkcie 2.1

2.3 Rozkład w pH 3

Do probówki Falcon odmierzyć 0,5 mL roztworu podstawowego α -amylazy gorzelniczej i 4,5 mL buforu o pH 3. Probówkę ogrzewać w temperaturze 37 °C przez 10 minut. Następnie dodać 5 mL roztworu skrobi. Natychmiast po tej czynności, pobrać 1 mL mieszaniny enzymu i skrobi i dodać do probówki nr 13 zawierającej roztwór jodu w jodku potasu oraz roztwór HCl. Kolejną porcję mieszaniny enzymu i skrobi (1 mL do probówki nr 14) pobierać po 20 minutach. Wykonać pomiary UV-VIS.

3. Rozkład skrobi pod wpływem α -amylazy ślinowej

Do 5 probówek szklanych dodać po 0,15 mL roztworu jodu w jodku potasu oraz po 0,5 mL 0,5 M roztworu HCl.

UWAGA – przed pobraniem śliny przepłukać usta ciepłą wodą. Około 1 mL śliny rozcieńczyć do objętości 100 mL. Następnie pobrać z tego 35 mL, umieścić w probówce Falcon i ogrzewać w 37 °C przez 10 minut. Po upływie tego czasu, dodać 10 mL roztworu skrobi. Zaraz po dodaniu, pobrać 1 mL mieszaniny enzymu i skrobi i dodać do probówki nr 1 z roztworem jodu w jodku potasu i roztworem HCl. Kolejne porcje pobierać po 1, 2, 3 i 5 minutach. Obserwować zmiany barwy roztworów oraz wykonać pomiary wartości absorbancji. Sporządzić wykres obrazujący rozkład skrobi w czasie (min).