



West Pomeranian  
University of Technology  
Szczecin



# ENZYMOLOGIA

*Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa*

**Centrum Bioimmobilizacji  
i Innowacyjnych Materiałów  
Opakowaniowych**

ul. Klemensa Janickiego 35  
71-270 Szczecin

## Ćwiczenie 5

### $\alpha$ -Amylaza (cz. II)

### Enzymatyczna hydroliza skrobi

**Amylasy** - mianem tym określa się zespół enzymów katalizujących przemianę skrobi i glikogenu do cukrów prostszych - maltozy (i niekiedy do glukozy). Od zamierzchłych czasów amylazy są wykorzystywane pod postacią słoðu, tj. odpowiednio skiełkowanych ziaren zbożowych, zwykle jęczmienia, poddanych przed użyciem zmiążdżeniu (zgnieceniu).

W ostatnich kilkunastu latach, zamiast słoðu coraz częściej stosuje się preparaty amyrolityczne pochodzenia pleśniowego (najczęściej wykorzystywane są mikroorganizmy z rodzaju *Aspergillus*) i bakteryjnego (najczęściej mikroorganizmy z rodzaju *Bacillus*), o wyższej aktywności od słoðu i pozwalające w sposób szybszy, dokładniejszy i tańszy (od dawnych klasycznych metod) realizować procesy scukrzania skrobi.

**Skrobia.** Składa się z dwóch wielocukrów - amylozy i amylopektyny - zbudowanych odmiennie z  $\alpha$ -D-glukopiranozy. **Amyloza** tworzy łańcuchy proste, zbudowane z cząsteczek glukozy sprzężonych ze sobą wiązaniem  $\alpha$ -1  $\rightarrow$  4. Natomiast **amylopektyna** charakteryzuje się budową rozgałęzioną; zasadniczym połączeniem cząsteczek glukozy jest również wiązanie  $\alpha$ -1  $\rightarrow$  4, lecz co 25-30 reszt glukozytowych występują wiązania  $\alpha$ -1  $\rightarrow$  6, tworzące rozgałęzienia. Stąd wynikają nieco inne właściwości fizyczne obu wielocukrów. Roztwory wodne amylopektyny bardziej opalizują, a w reakcji z jodem wykazują zabarwienie fioletowe, podczas gdy amyloza barwi się z jodem na kolor ciemnoniebieski.

Wśród enzymów rozkładających hydrolitycznie skrobię, glikogen i pokrewne cukry wyróżnia się **3 główne grupy:**

- 1)  **$\alpha$ -amylazy** (endoamylazy), rozszczepiające wiązania wewnątrz cząsteczek substratu w sposób przypadkowy,
- 2)  **$\beta$ -amylazy** (egzoamylazy), hydrolizujące co drugie wiązanie od nieredukującego końca substratu,
- 3) **glukoamylazy** (egzoamylazy), hydrolizujące kolejno każde wiązanie od nieredukującego końca substratu. Należą one do klasy hydrolaz, podklasy 3.2 (działające na związki glikozyłowe), pod-podklasy 3.2.1 (hydrolazy glikozydów). W rozkładzie skrobi i glikogenu współdziałają z amylazami enzymy rozkładające wiązania  $\alpha$ ,1 $\rightarrow$ 6-glikozydowe.

**$\alpha$ -Amylaza (EC 3.2.1.1, 4-glukanohydrolaza  $\alpha$ ,1 $\rightarrow$ 4-glukanu).**  $\alpha$ -Amylazy występują powszechnie u roślin, zwierząt i mikroorganizmów. Rozkładają one amylopektynę, amylozę i glikogen, stopniowo do coraz to mniejszych fragmentów, zwanych dekstrynami. Końcowymi

produktami są: małowcząsteczkowe dekstryny zawierające zwykle jedno wiązanie  $\alpha,1\rightarrow6$ -glikozydowe, maltoza i glukoza. Konsekwencją stopniowej depolimeryzacji jest szybki spadek lepkości i zabarwienia z jodem roztworów wysokopolimeryzowanych substratów. Cząsteczki  $\alpha$ -amylaz zawierają wapń. Jest on czynnikiem stabilizującym enzym oraz odpowiedzialnym za jego aktywną konformację. Nie uczestniczy natomiast w bezpośrednim tworzeniu kompleksu enzym-substrat. Niektóre  $\alpha$ -amylazy są aktywowane przez jony chlorkowe.

**$\beta$ -Amylaza (EC 3.2.1.2, maltohydrolaza  $\alpha,1\rightarrow4$ -glukanu).**  $\beta$ -Amylazy są rozpowszechnione u roślin wyższych; u zwierząt nie stwierdzono ich obecności. W wyniku ich działania uwalniają się cząsteczki maltozy. Hydrolizując wiązania  $\alpha,1\rightarrow4$ -glikozydowe zmieniają konfigurację  $\alpha$  przy  $C_1$  glukozy w konfigurację  $\beta$ . Z tego też powodu nazwano je  $\beta$ -amylazami. Amylopektynę i glikogen rozkładają tylko w około 50%, ponieważ wiązania  $\alpha,1\rightarrow6$ -glikozydowe przeszkadzają im w działaniu. Niestrawiona reszta wykazuje wysoki stopień polimeryzacji i jest nazwana dekstryną graniczną  $\beta$ -amylazy. Aktywność molekularna  $\beta$ -amylaz jest jedną z największych. Cząsteczka enzymu może hydrolizować około 252 000 wiązań na minutę. Dla jego funkcjonowania są istotne grupy sulfhydrylowe.

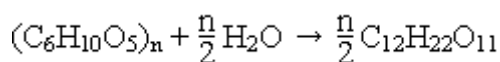
**Glukoamylaza (EC 3.2.1.3, glukohydrolaza  $\alpha,1\rightarrow4$ -glukanu).** Glukoamylazy występują u roślin, zwierząt i bakterii. Są to enzymy usuwające kolejno reszty glukozy od nieredukującego końca substratów. Podczas rozszczepiania wiązań powodują, podobnie jak  $\beta$ -amylaza, przemianę konfiguracji  $\alpha$  glukozy w konfigurację  $\beta$ . Hydrolizują nie tylko wiązania  $\alpha,1\rightarrow4$  lecz także  $\alpha,1\rightarrow6$ -glikozydowe. Stąd glukoamylazy mają zdolność do hydrolizy skrobi prawie ilościowo do glukozy i w związku z tym znalazły zastosowanie do produkcji glukozy. W cząsteczkach ich stwierdzono obecność składnika cukrowego, nie wykazano jednak dokładnie jego funkcji.

Dobór właściwej metody oznaczania aktywności amylolitycznej zależy od rodzaju badanego enzymu. Do oznaczania aktywności  $\alpha$ -amylazy można stosować zarówno metody polegające na pomiarze zaniku zabarwienia z jodem lub zmniejszenia lepkości, jak i na pomiarze uwolnionych grup redukcyjnych. W przypadku natomiast  $\beta$ -amylazy, glukoamylazy oraz mieszaniny różnych enzymów amylolitycznych lepiej odzwierciedla aktywność pomiar uwolnionych grup redukujących.

**Amylazy** znajdują zastosowanie:

- 1) w gorzelnictwie rolniczym - przy zacieraniu i cukrowaniu surowców skrobiowych, głównie ziemniaków, żyta lub kukurydzy → po odpowiednim rozparzeniu i doprowadzeniu skleikowanej (według niektórych źródeł – sklejstrowanej), półpłynnej masy do odpowiedniej temperatury;
- 2) w browarnictwie - przy scukrzaniu skrobi zawartej w samym słodzie, w wyniku czego otrzymuje się brzeczkę, która po dochmieszeniu stanowi właściwy substrat do fermentacji alkoholowej w procesie wyrobu piwa;
- 3) w piekarstwie - w celu wytworzenia pewnych ilości cukrów ze skrobi cięście, co ułatwia fermentację ciasta (zwiększając pulchność pieczywa) oraz przedłuża świeżość pieczywa;
- 4) w przetwórstwie krochmalniczym, przy modyfikowaniu cech fizycznych ziemniaczanej mączki oraz, niekiedy, przy produkcji syropów;
- 5) w produkcji różnego typu odżywek, szczególnie dla dzieci;
- 6) w cukiernictwie do hydrolizy odpadów cukierniczych i uzyskiwania z nich cukru.

Ogólnie, w wyniku działania amylaz na skrobię (zwykle uprzednio skleikowaną) zachodzi stopniowa jej hydroliza, przechodzenie w dekstryny i w końcu – w maltozę. Prawie zawsze hydroliza pewnej części skrobi (np. 30%) zatrzymuje się w stadium dekstryn i pod wpływem amylaz słodowych nie może całkowicie przejść w maltozę. Ogólnie scukrzenie przedstawia się za pomocą równania:

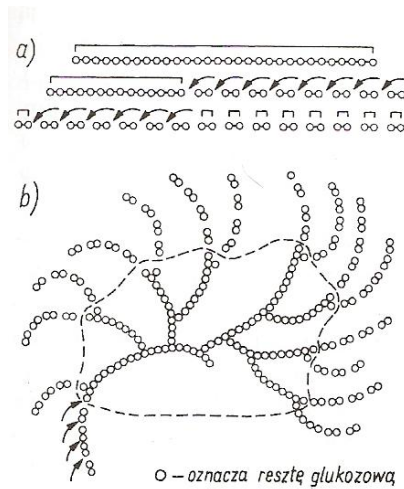


Przy czym  $n$  (liczba charakteryzująca stopień polimeryzacji cząsteczki skrobi) jest bardzo duże i wynosi 60-1200 w przypadku amylozy i 1200-36000 w amylopektynie. Zacieranie i scukrzanie prowadzi się w granicach temperatur od 50 do 65°C oraz pH od 4 do 5.

Najważniejsze amylazy to  $\beta$ -amylaza i  $\alpha$ -amylaza (terminologia wg Kuhna).

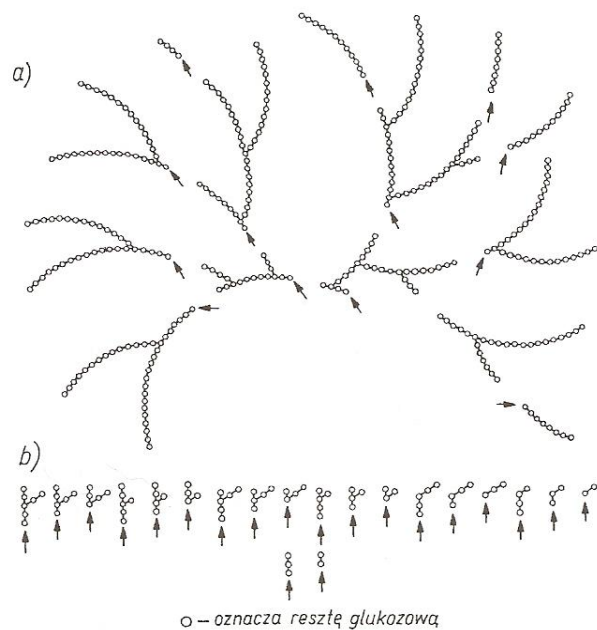
**$\beta$ -Amylaza, maltohydrolaza  $\alpha$ -1,4-glukanu** (dawniej zwana amylazą cukrującą) odszczepia z końców łańcuchów amylozowych (od strony nie aldehydowej) cząsteczki maltozy, powodując stopniowe zmniejszanie się łańcucha, jest więc egzoamylazą. Ponieważ enzym ten atakuje tylko wiązania typu 1:4 glikozydowe, nie może zaś rozdzielać wiązań 1:6, przeto w przypadku amylopektyny działanie  $\beta$ -amylazy zatrzymuje się po dojściu do tego typu wiązania (pozostają wtedy duże cząsteczki rozgałęzione, zakończone w odgałęzieniach połączeniami 1:6 glikozydowymi. Działanie  $\beta$ -amylazy na amylozę i amylopektynę

schematycznie przedstawia rys. 1. Enzym ten scukrza (tj. doprowadza do maltozy) tylko 70% amylozy, a znacznie mniejszą część amylopektyny (ze względu na jej rozgałęzienia).



Rys. 1. Działanie  $\beta$ -amylazy na skrobię: a) na amylozę, b) na amylopektynę (strzałki wskazują miejsce działania enzymu (Pijanowski i in., 2004)

**$\alpha$ -Amylaza, 4-glukoanohydrolaza  $\alpha$ -1,4-glukanu**, ma zdolność jakby krajania prostych lub rozgałęzionych łańcuchów poliglukozydowych w miejscach wiązań 1:4, z dalszym „siekaniem” tych fragmentów także wewnątrz skrobi i doprowadzaniem ich aż do maltozy. Jest więc endoamylazą, a ponieważ enzym ten też nie atakuje wiązań 1:6-glikozydowych, przeto obok maltozy uzyskuje się pewną ilość nieco większych członów z odgałęzieniami w połączeniach 1: 6 (tzw. dekstryny graniczne - rys. 2).



Rys. 2. Działanie  $\alpha$ -amylazy na amylopektynę: a) amylopektyna częściowo rozłożona, b) amylopektyna całkowicie rozłożona (Pijanowski i in., 2004)

Cechą charakterystyczną  $\alpha$ -amylazy jest obecność przynajmniej jednego atomu Ca w jednej cząsteczce enzymu. Wapń stabilizuje cząsteczkę enzymu i chroni ją przed działaniem enzymów proteolitycznych. W zależności od pochodzenia  $\alpha$ -amylazy różnią się masą cząsteczkową (zwykle 50 tys., a z bakterii ok. 100 tys.), optimum pH (ze słodu jęczmiennego 4,5-5,0, z trzustki 6,9-8,0) i optimum temperatury (z pleśni 50-55°C, z bakterii 65-85°C).

Zdolność doprowadzania do maltozy reszty dekstryn niescukrzonych wykazuje enzym Z, dopełniając jakby działania  $\beta$ -amylazy.

Znane są jeszcze inne rodzaje amylaz. Na przykład glukoamylaza (amyloglukozydaza, glukohydrolaza  $\alpha$ -1,4-glukanu) hydrolizująca przede wszystkim wiązania glikozydowe  $\alpha$ -1,4 i w niewielkim stopniu wiązania  $\alpha$ -1,3 i  $\alpha$ -1,6. Może ona doprowadzić do zamiany skrobi w glukozę. Działanie jej na łańcuch skrobiowy jest podobne do  $\beta$ -amylaz, z tym że oddziela ona z tego łańcucha nie maltozę, lecz glukozę, w następstwie rozdzielania nie co drugiego, lecz każdego wiązania 1:4. Inny enzym, zwany amylo-1,6-glukozydazą (lub enzymem R), otrzymywany np. z pleśni rodzaju *Rhizopus*, hydrolizuje wiązanie 1:6 i jest wykorzystywany razem z innymi amylazami.

W praktyce gorzelniczej, browarniczej i piekarniczej rozszczepienie maltozy do glukozy następuje pod wpływem maltazy drożdżowej.

## Część doświadczalna

### **Ćwiczenie 5. $\alpha$ -Amylaza - enzymatyczna hydroliza skrobi**

W doświadczeniu wykorzystana zostanie  $\alpha$ -amylaza pochodzenia bakteryjnego wyprodukowana przez mikroorganizmy z rodzaju *Bacillus*

**I.** Przygotować probówki zawierające po 1cm<sup>3</sup> roztworu jodu (2 zestawy po 8 sztuk).

**II.** Następnie przygotować dwa kleiki skrobiowe i przeprowadzić doświadczenia według poniższych instrukcji:

#### **Kleik nr 1**

1) Na wadze analitycznej odważyć 6 g skrobi.

2) Odważoną skrobię przenieść do wytarowanej kolby stożkowej o poj. 300 cm<sup>3</sup>.

3) Zawartość uzupełnić wodą destylowaną do 200 g. Kolbę umieścić na wrzącej łaźni wodnej na okres 5 minut intensywnie mieszając zawartość (w celu otrzymania homogenicznego kleiku).

4) Następnie otrzymany kleik gotować przez kolejne 5 minut. Całość schłodzić do temperatury 40°C i po wytarciu kolby z zewnątrz uzupełnić ewentualne ubytki wody do całkowitej masy mieszaniny 200 g. Całość starannie wymieszać, pobrać próbkę zerową (1 cm<sup>3</sup>) i dodać ją do probówki zawierającej roztwór jodu.

5) Do pozostałego kleiku (znajdującego się w kolbie) dodać 2 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu i zawartość intensywnie wymieszać.

Hydroлизę prowadzić w temperaturze 40°C (umieszczając kolbę zawierającą kleik w łaźni wodnej). Przed każdorazowym pobraniem próbki zawartość kolby wymieszać. Próbki do badań należy pobrać po 2, 5, 10, 15, 20, 30, 35 minutach i pobrane próbki (1 cm<sup>3</sup>) dodawać do kolejnych probówek zawierających roztwór jodu.

### **Kleik nr 2**

Czynności pkt 1-4 wykonujemy analogicznie jak podczas przygotowywania kleiku nr 1.

**5) Po pobraniu próbki zerowej, kleik 2 inkubować w łaźni wodnej o temperaturze 40°C bez dodawania enzymu!**

Próbki do badań należy pobrać po 2, 5, 10, 15, 20, 30, 35 minutach i pobrane próbki (1 cm<sup>3</sup>) dodawać do kolejnych probówek zawierających roztwór jodu.

**III. Oznaczenie lepkości kleików skrobiowych po 35-minutowej inkubacji (z dodatkiem i bez dodatku enzymu) należy przeprowadzić przy użyciu wypływowego miernika lepkości typu KUBEK FORDA.**

### **Zasada metody:**

Oznaczenie lepkości polega na pomiarze czasu wypływu [s] cieczy o objętości 60 cm<sup>3</sup> przez dyszę o średnicy 3 mm w temperaturze 40°C.

### **Sposób przeprowadzenia pomiaru:**

- zatykając palcem otwór w probówce typu Falcone nalać do probówki **kleik o temperaturze 40°C** (probówka powinna być wypełniona w całości, ciecz należy wyrównać z rantem probówki poprzez zgarnięcie jej nadmiaru bagietką lub łyżeczką),
- następnie równocześnie ze ściągnięciem palca z otworu w probówce włączamy stoper mierząc czas, podczas którego wypłynie cała zawartość probówki (oznaczenie wykonać w trzech powtórzeniach zarówno dla kleiku nr 1, jak i nr 2),
- zanotować czasy wypływu kleików w poniższej tabeli, wyliczyć wartość średnią dla kleików nr 1 i 2, a następnie zinterpretować uzyskane wyniki.

		<b>Kleik skrobiowy 1 (inkubowany z dodatkiem enzymu)</b>	<b>Kleik skrobiowy 2 (inkubowany bez dodatku enzymu)</b>
<b>Czas wypływu z kubka Forda [s]</b>	Pomiar 1		
	Pomiar 2		
	Pomiar 3		
	Wartość średnia ± odch. stand.		

**Literatura:**

- 1) Ćwiczenia z biochemii. Praca zbiorowa pod red. L. Kłyszajko-Stefanowicz. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- 2) Ogólna technologia żywności. Pijanowski E., Dłużewski M., Dłużewska A., Jarczyk A. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2004.