



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską

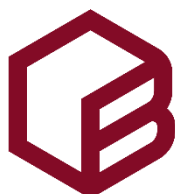


	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

*Projekt pt.: „STUDENCI HIPOKRATESA - kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej” w ramach programu Fundusze Europejskie dla Rozwoju Społecznego 2021-2027 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Plus, nr umowy: FERS.01.05-IP.08-0335/23-00*

# INSTRUKCJE DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z BIOCHEMII

*dla kierunku lekarskiego  
Politechniki Bydgoskiej  
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich*



**POLITECHNIKA  
BYDGOSKA**  
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich



## ĆWICZENIE 8.

### Oznaczanie aktywności amylaz ze słodu jęczmiennego i śliny

#### A. Oznaczanie aktywności amylaz ze słodu jęczmiennego

Amylazy są to enzymy należące do klasy hydrolaz. Wyróżnić można  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  amylazy rozkładające w różny sposób łańcuch wielocukrów (skrobi, glikogenu) oraz wykazujące odmienne właściwości fizyczne (ze względu na zróżnicowane pH oraz temperaturę a także zawartość jonów metali). Enzymy te występują w różnych tkankach roślinnych oraz w sokach trawiennych zwierząt i ludzi.

$\alpha$ -amylaza (EC 3.2.1.1) tzw. endoamylaza katalizuje rozszczepienie wiązań  $\alpha$ -1,4 glikozydowe wewnątrz cząsteczki substratu.

$\beta$ -amylaza (EC 3.2.1.2) tzw. egzoamylaza hydrolizuje wiązania  $\alpha$ -1,4 glikozydowe, odszczepiając sukcesywnie jednostki maltozy od nie redukującego łańcucha. W przypadku amylopektyn nie działając na wiązania  $\alpha$ -1,6 glikozydowe jako produkt reakcji tworzy tzw. „dekstryny graniczne”.

1,6-glikozydaza (EC 3.2.1.33) tzw.  $\gamma$ -amylaza katalizuje rozszczepienie wiązań  $\alpha$ -1,6 glikozydowych w amylopektynie, które występują w miejscach rozgałęzień łańcucha.

Produktami reakcji przy działaniu  $\alpha$ -amylazy są początkowo niskocząsteczkowe dekstryny zawierające 6-7 reszt glukozy, a w dalszej kolejności maltoza i niewielka ilość glukozy. Pod działaniem  $\alpha$ -amylaz szybko spada lepkość roztworu skrobi oraz zanika zdolność do barwienia się jodem, natomiast redukcyjność wzrasta po pewnym czasie.

Produktem reakcji  $\beta$ -amylazy są cząsteczki maltozy i wysokocząsteczkowe tzw. „dekstryny graniczne”. Podczas działania  $\beta$ -amylazy na roztwór skrobi jego lepkość, jak również zdolność barwienia się jodem zanikają bardzo powoli, natomiast szybko zwiększa się ilość cukru redukującego –maltozy.

Amylazy roślinne działają w szerokich granicach pH i temperatury. Optymalną jest temperatura w zakresie 20-40°C, natomiast pH nie wypada w tak szerokim zakresie. Dla  $\alpha$ -amylazy optymalne pH przypada 6,5 dla  $\beta$ -amylazy 4,3.

#### *Izolacja $\alpha$ i $\beta$ -amylazy z nasion jęczmienia*

Okolo 2 g ześrutowanych ziaren jęczmienia zadać 25 ml roztworu ekstrahującego (1% roztworu NaCl w 0,002 M CaCl<sub>2</sub>) i wytrząsać przez 20 minut. Następnie sączyć przez karbowany sączek do kolby stożkowej (przed sączeniem sączek – zwilżyć wodą destylowaną). Uzyskany ekstrakt jest roztworem  $\alpha$  i  $\beta$ -amylaz.



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską



#### a) *Oznaczenie aktywności $\alpha$ -amylazy*

Aktywność  $\alpha$ -amylazy oznacza się na podstawie spadku zawartości skrobi w mieszaninie reakcyjnej. Zawartość skrobi mierzy się kolorymetrycznie po utworzeniu barwnego kompleksu z jodem.

#### **Próba właściwa**

Do dwóch probówek odmierzyć po 1 ml roztworu skrobi, 1,0 ml wyciągu enzymu; dobrze wymieszać. Po 5 minutach reakcję enzymatyczną przerwać przez dodanie 1 ml odczynnika jodowego. Wymieszać i dokonać pomiaru absorbancji na spektrofotometrze przy długości fali 670 nm wobec wody destylowanej.

#### **Próba kontrolna**

Do dwóch probówek odmierzyć po 1 ml roztworu skrobi. Po 5 minutach dodać 1 ml odczynnika jodowego, wymieszać i mierzyć absorbancję jak w próbie właściwej.

Aktywność enzymu wyznaczyć z różnicy odczytów absorbancji pomiędzy próbą kontrolną i właściwą, wynik podać w jednostkach umownych.

Za **jednostkę aktywności  $\alpha$ -amylazy** przyjąć taką ilość enzymu, która w ciągu minuty w warunkach doświadczenia zmienia ekstynkcję o 0,1. Całkowitą aktywność  $\alpha$ -amylazy określić w jednostkach aktywności na 1g masy słoðu uwzględniając rozcieńczenie enzymu.

#### **Wyniki:**



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



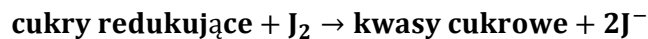
Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską

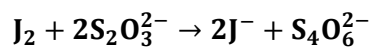


## b) Oznaczanie aktywności $\beta$ -amylazy

Oznaczenie polega na jodometrycznym określeniu zawartości cukrów redukujących, reprezentowanych prawie wyłącznie przez maltozę. W środowisku alkalicznym pod wpływem jodu przebiega reakcja:



Używając mianowany roztwór tiosiarczanu sodu oznacza się całkowitą zawartość dodanego jodu (próba kontrolna) oraz nadmiar jodu po reakcji z cukrem (próba właściwa). Zawartość cukrów redukujących oblicza się z różnicy tych dwóch miareczkowań. Podczas których przebiega reakcja:



### Próba właściwa

Do dwóch kolb stożkowych o pojemności 100 ml odmierzyć po 10 ml roztworu skrobi. Po 5 minutach dodać 1 ml wyciągu enzymatycznego. Zawartość kolb wymieszać i dodać po 10 ml roztworu jodu (0,07N roztwór  $\text{J}_2$ ). Kolby pozostawić w ciemności na 20 minut. Następnie dodać 2,5 ml 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , wymieszać i miareczkować mianowanym 0,04N roztworem tiosiarczanu sodu do momentu zaniku barwy.

### Próba kontrolna

Próbkę kontrolną wykonać analogicznie jak próbkę właściwą bez dodawania wyciągu z ziaren jęczmienia (NIE DODAWAĆ ENZYMU)

Aktywność  $\beta$ -amylazy oblicza się wg wzoru:

$$\text{Jednostka aktywności} = \frac{(a - b) \times 6840 \times 25}{342 \times 30}$$

Jednostka aktywności  $\beta$ -amylazy – ilość enzymu uwalniająca 1  $\mu\text{mol}$  maltozy w ciągu 1 minuty na 1 g słodu

**a**-ilość ml tiosiarczanu sodu zużyta na zmiareczkowanie próby kontrolnej

**b**-ilość ml tiosiarczanu sodu zużyta na zmiareczkowanie próby badanej (właściwej)

**6840** -współczynnik uwzględniający ilość maltozy w  $\mu\text{g}$  odpowiadający 1 ml 0,02 M tiosiarczanu sodu

**342**- masa cząsteczka maltozy

**Wyniki:**



c) Aktywatory i inhibitory amylazy ślinowej.

Na aktywność enzymów wywiera wpływ szereg związków chemicznych zawartych w tkankach. Jedne z nich zwiększają aktywność enzymów (aktywatory) inne na odwrót silnie hamują reakcje enzymatyczne (inhibitory).

### Wykonanie

Do 3 probówek dodajemy następujące roztwory:

Probówki				Obserwacja (kolor)
1	1 ml wody destylowanej	2 ml 1% roztworu skrobi	Dodać 1 ml roztworu śliny. Wstawić do termostatu w temp. 38 C°  na 15 min następnie dodać 2-3 krople płynu Lugola	
2	1 ml 1% NaCl	2 ml 1% roztworu skrobi		
3	1 ml 1% Cu SO <sub>4</sub>	2 ml 1% roztworu skrobi		