

Amylaasi ja tärkkelyksen hydrolyysi

Pauliina Lankinen, Antti Savin ja Sari Timonen

Mikrobiologian ja biotekniikan osasto, Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos

Työn tavoite

Työssä on tarkoitus osoittaa mikrobien kykyä tuottaa tärkkelystä hajottavia entsyymejä.

Taustaa

Tärkkelys on tuhansista glukoosiyksiköistä rakentunut ketjumainen polysakkaridi, joka esiintyy joko suoraketjuisena amyloosina tai haarautuneena amylopektiininä. Yhteyttävät kasvit varastoivat fotosynteesissä tuottamansa glukoosin usein tärkkelyksen muodossa. Kasveilla tärkkelyksen tehtävä on toimia energiavarastona. Etenkin kasvien siemenet sisältävät paljon tärkkelystä. Suurimmalle osalle maapallon ihmisistä tärkkelys on pääasiallinen hiilihydraattien lähde. Ravinnossamme tärkkelyspitoisia elintarvikkeita ovat etenkin viljakasvit (vehnä, riisi ja maissi) sekä peruna.

Tärkkelyksen sisältämän energian hyödyntämiseksi niin bakteerien, sienien, kasvien kuin eläintenkin on ensin pilkkottava se pienemmiksi sokeriyksiköiksi. Pilkkomiseen eliöt käyttävät amylaaseja. Kaikille amylaaseille on ominaista, että ne pilkkovat tärkkelyksen glykoosimolekyylien välisiä 1,4- α -glykosidisia sidoksia. Yleisin tärkkelystä pilkkova amylaasi on alfa-amylaasi. Sitä tuottavat kaikki tärkkelystä hyödyntävät organismit. Ihmisillä alfa-amylaasia on etenkin syljessä ja haimanesteessä. Alfa-amylaasi hydrolysoi tärkkelystä sattumanvaraisista kohdista tuottaen eripituisia glukoosiyhdisteitä. Haarautumaton amyloosi pilkkoutuu maltoosiksi (2 glukoosia) ja maltotriooseksi (3 glukoosia), haarautuva amylopektiini taas maltoosiksi (2 glukoosia), glukoosiksi (1 glukoosi) ja dekstriineiksi (useita glukooseja). Alfa-amylaasi on aktiivinen neutraalissa pH-arvossa. Monet bakteerit, sienet ja kasvit tuottavat beta-amylaasia. Beta-amylaasi pilkkoo tärkkelystä vapauttaen maltoosia.

Teollisuudessa amylaaseja hyödynnetään erilaisiin käyttötarkoituksiin. Pesuaineissa amylaaseja käytetään tehostamaan tärkkelyspitoisten likojen puhdistusta. Elintarviketeollisuudessa amylaaseja voidaan hyödyntää jauhonparanteena tehostamaan hiivan ravinteiden saantia. Jauhonparanteena käytetään etenkin mallastetusta ohrasta saatavia alfa- ja beta-amylaaseja.

Työn periaate

Tässä työssä on tarkoitus tutkia eri mikrobin kykyä hajottaa tärkkelystä tuottamalla sitä pilkkovia entsyymejä. Mikrobia kasvatetaan tärkkelystä sisältävällä alustalla. Mikäli mikrobi tuottaa tärkkelystä pilkkovia entsyymejä, tällöin tärkkelys häviää kasvuston ympäriltä. Tärkkelyksen pilkkoutuminen osoitetaan jodiliuoksen avulla. Sitoutuessaan tärkkelykseen jodi muodostaa tummansinisen kompleksin. Pilkkoutuneen tärkkelyksen ympärille jää väritön alue. Yhdelle maljalle viljellään sekä tärkkelystä pilkkovaa mikrobia (positiivinen reaktio) että mikrobia joka ei kykene pilkkomaan tärkkelystä (negatiivinen reaktio).

Työhön liittyviä kysymyksiä ja tehtäviä

- Miksi kasvisolut varastoivat tuotetun sokerin tärkkelyksen muodossa eivätkä yksittäisinä glukoosimolekyyleinä?
- Mitä on mallastus?

Työturvallisuus

Työssä käytettävät mikrobit eivät ole ihmisille haitallisia, mutta niitä tulee silti käsitellä varoen ja vältettävä kontaminaatiota. Työskennellessä on hyvä käyttää suojahanskoja.

Arvioitu aika

30 minuuttia tai 2-3 päivää jos ei käytetä valmiiksi viljeltyjä tärkkelysagarmaljoja.

Tarvikkeet

- Jodiliuos (esim. Betadine apteekista tai Lugolin-liuos), käytä tuoretta liuosta
- Mikrobin puhtausviljelmiä positiiviseksi ja negatiiviseksi kontrolliksi:
 - hajottavaksi sopii esim. *Bacillus subtilis*
 - ei hajottavia esim. *Escherichia coli* ja *Saccharomyces cerevisiae*.
- Kiinteitä tärkkelysravintoalustoja valettuna petrimaljoihin. Sopivia ravintoalustoja ovat esimerkiksi TY ja TGY. Litraan alustaa lisätään 2 g tärkkelystä ja 15 g agaria. Lämmin sula alusta valetaan steriileihin petrimaljoihin (15-20 ml alustaa/malja).
- Steriilejä lasisauvoja tai siirrostussilmukka
- Kertakäyttöisiä Pasteur-pipettejä

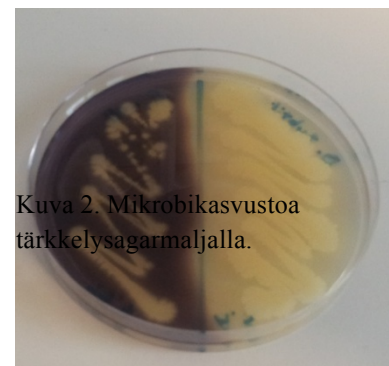
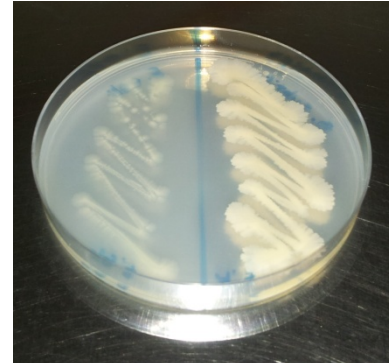


Kuva 1. Mikrobin puhtausviljelmiä vinopintaviljelminä.

Työn suoritus

Jos työ suoritetaan valmiiksi viljellyillä tärkkelysagarmaljoilla, työ aloitetaan kohdasta 4.

1. Jaa tärkkelysagarmalja kahteen puoliskoon vetämällä viiva maljan pohjaan. Merkitse maljan pohjaan, minkä mikrobin aiot siirrostaa millekin puoliskolle.
2. Siirrosta mikrobimassaa puhdasviljelmistä tai omasta viljelmästäsi tärkkelysagarmaljalle steriilillä lasisauvalla tai siirtosilmukalla. Siirrosta positiivinen mikrobi toiselle ja negatiivinen mikrobi toiselle puoliskolle. Voit myös testata sekaviljelmää haluamastasi kohteesta. Sekaviljelmän saat aikaan vaikkapa ripottelemalla hiukan maata tai koskemalla sormilla ravintoalustan pintaa.
3. Maljalle viljeltyjen mikrobien annetaan kasvaa 2-3 vuorokautta (Kuva 2). Kasvatusolosuhteet riippuvat käytetyistä mikrobeista. Esimerkiksi huoneenlämpö sopii monien mikrobien kasvatukseen.
4. Peitä maljojen pinta jodiliuoksella pesäkkeiden ilmestyttyä. Seuraa värinmuutosta ja kirjaa tulokset ylös. Tumma väri mikrobikasvuston ympärillä osoittaa, että mikrobi ei tuota tärkkelystä hajottavia entsyymejä sillä maljan tärkkelys on yhä jäljellä (Kuva 3).



Kuva 2. Mikrobikasvustoa tärkkelysagarmaljalla.

Kuva 3. Jodiliuoksella peitetty malja (oikealla positiivinen ja vasemmalla negatiivinen reaktio).

Havainnot työstä

- Kuinka nopeasti värimuutos oli havaittavissa jodiliuoksen lisäyksen jälkeen?

Näyte	Reaktio: + / -	Reaktioon kulunut aika
<i>E. coli</i>		
<i>B. subtilis</i>		
Oma näyte:		

Vastauksia kysymyksiin

Miksi kasvisolut varastoivat tuotetun sokerin tärkkelyksen muodossa eivätkä yksittäisinä glukoosimolekyyleinä?

Yksittäiset glukoosimolekyylit liukenevat veteen. Solun sisällä vapaat glukoosimolekyylit sitoutuvat vesimolekyyleihin vieden tilaa solun sisällä. Liian suuri glukoosipitoisuus solun sisällä aiheuttaa myös soluille osmoottista stressiä. Tärkkelyksessä amyloosi ja amylopektiini ketjut ovat sitoutuneena toisiinsa vetysidoksilla, muodostaen tiiviitä tärkkelysjyväsiä. Rakenteen johdosta tärkkelys ei liukene veteen. Tämän takia soluissa tärkkelys ei aiheuta osmoottista stressiä ja glukoosimolekyyleihin verrattuna pystytään varastoimaan kompaktimmin.

Mitä on mallastus?

Mallastus on viljan idättämistä, jonka tarkoituksena on muuttaa jyvän tärkkelys liukenevampaan muotoon, aktivoimalla jyvän amylaasien muodostuminen. Mallastus jaetaan kolmeen eri vaiheeseen, jotka ovat liotus, idätys ja kuivaus. Liotuksessa jyvien kosteusprosentti nostetaan noin 45 %, jolloin jyvät alkavat itämään. Itäessään jyvät alkavat tuottaa amylaaseja, jotka muokkaavat tärkkelyksen liukenevampaan muotoon. Kun haluttu itämisaste on saavutettu, jyvät kuivataan itämisen pysäyttämiseksi. Yleisin mallastettu vilja on ohra, jota käytetään mm. oluen raaka-aineena.

Tarviketietoa

Mikrobien puhdasviljelmiä on saatavilla esim. HAMBI-kantakokoelmasta, riitta.saastamoinen@helsinki.fi n. 80 € kanta).

Tärkkelysagaralustaksi käy jokin yleinen ravintoagar, johon lisätään 2 g tärkkelystä. Yleisiä ravintoalustoja ovat esimerkiksi TY ja TGY. Kertakäyttöisiä petrimaljoja ja alustoja voi ostaa VWR International laboratoriotuotemyynnistä. Voit myös tiedustella valmiita maljoja Mika Kalsilta Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitokselta Helsingin yliopiston maatalous-metsätieteellisestä tiedekunnasta, mika.kalsi@helsinki.fi