

REAZIONE CROMATICA DELL'AMIDO E RICERCA DELLA PRESENZA DELL'AMILASI NEI MICRORGANISMI

Prof.ssa Paola Meneghetti

IIS «G.A. REMONDINI»

Bassano del Grappa

- Struttura dell'amido e azione amilasi
- Preparazione liquido di Lugol
- Preparazione salda d'amido
- Reazione colorimetrica dell'amido
- Reazione colorimetrica degli alimenti che contengono amido
- Verifica presenza amilasi nei microrganismi

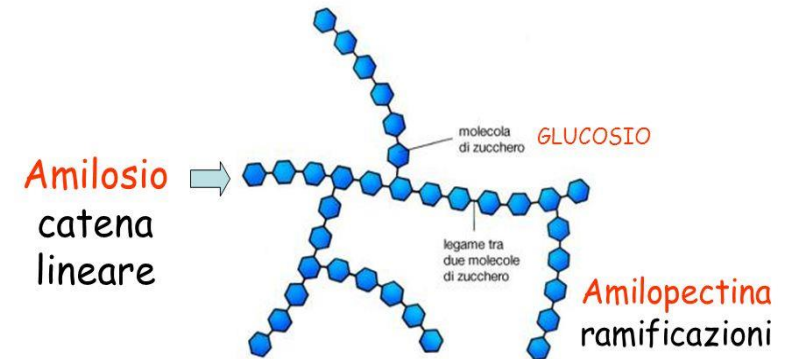
Struttura dell'amido e azione amilasi

L'amido è un polimero di riserva presente nei vegetali



è un omopolisaccaride del D-glucosio
costituito da 2 differenti polimeri
l'amilosio presente per il $20\pm 5\%$ e
l'amilopectina presente per il $75\pm 5\%$

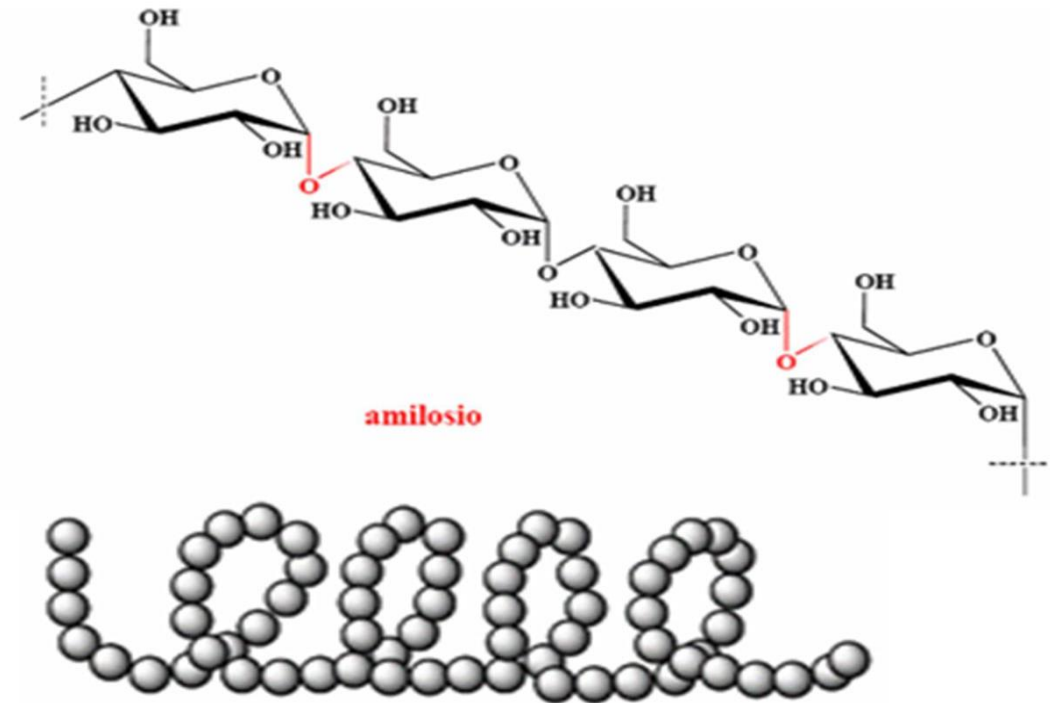
Struttura dell'amido: polisaccaride



Amilosio e amilopectina formano un reticolo cristallino

Amilosio

è solubile in acqua è formato da lunghe catene lineari di D-glucosio le molecole di glucosio sono legate fra loro da legami alfa 1-4 glicosidici



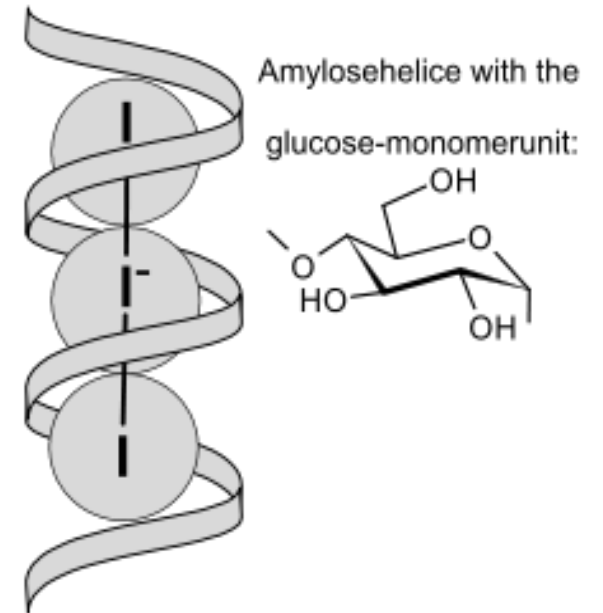
le catene si avvolgono formando delle spirali formate da 6 molecole di glucosio per giro

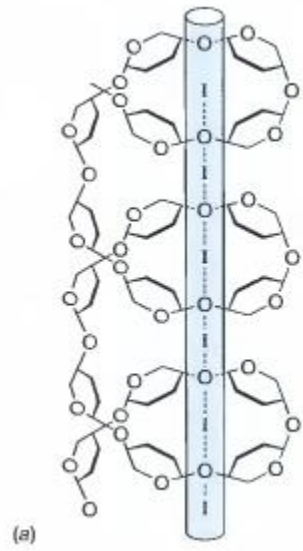
qui si andrà ad inserire lo ione I_3^- responsabile della reazione colorimetrica

lo ione triioduro

tende a complessarsi con la spirale dell'amilosio

assorbendo la luce producendo una colorazione blu



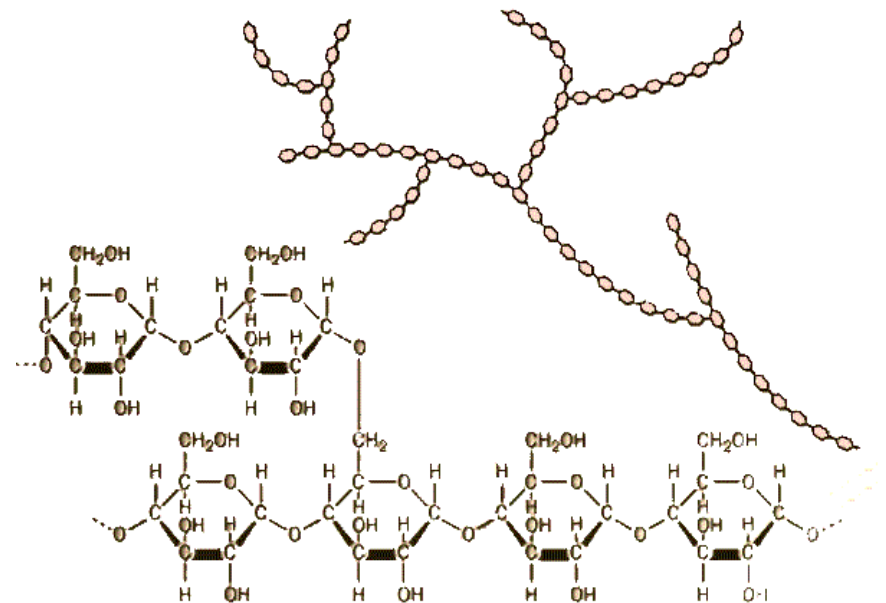


Amilopectina

non è solubile in acqua è formata da catene lineari di D-glucosio con legami alfa 1,4 glicosidici

ogni 24-30 molecole di glucosio sono presenti ramificazioni determinate da legami alfa 1-6 glicosidici che conferiscono una struttura a rete

non da reazione colorimetrica con lo iodio



Amilasi

Sono un gruppo di enzimi che idrolizzano i legami glicosidici
dall'idrolisi dell'amilosio si ottengono maltosio o maltotriosio e quindi
glucosio

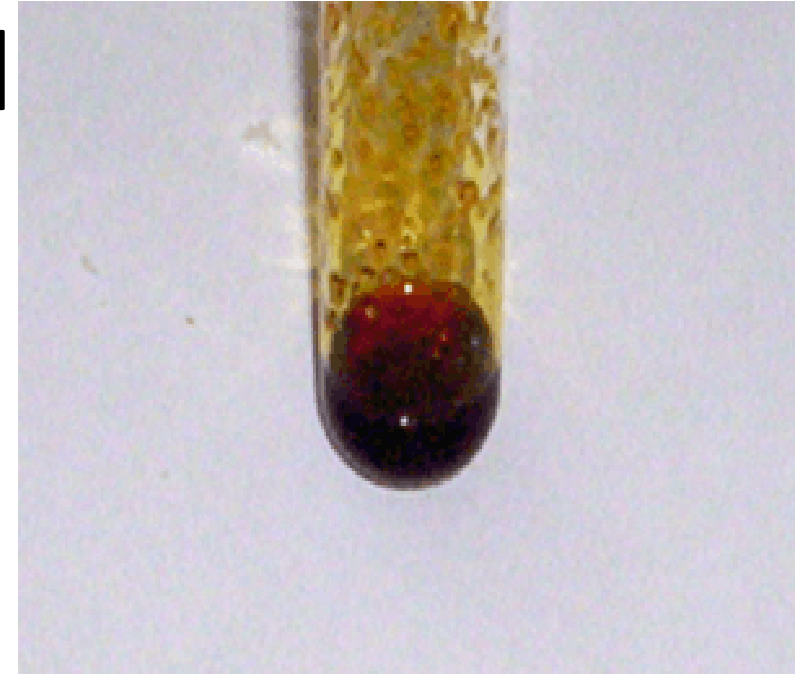
dall'idrolisi dell'amilopectina si ottengono destrine (C5-C9) ed infine
glucosio

i prodotti di demolizione dell'amido non daranno reazione
colorimetrica con lo I_3^-

Preparazione liquido di Lugol



- reagenti
- 20 gr di KI
- 100ml di acqua distillata
- 10gr di iodio cristallino
- mettere in un becher dell'acqua aggiungere KI e poi lo iodio cristallino mescolare e aggiungere a poco a poco il resto dell'acqua
- la soluzione ottenuta si presenta con una colorazione giallo-bruno
- la soluzione di lavoro si ottiene diluendo 1:4 la soluzione madre
- ricordiamo che il liquido di Lugol è nocivo per inalazione, nocivo per contatto con la pelle, altamente tossico per gli organismi acquatici
- durante la manipolazione lavorare sotto cappa di aspirazione e indossare i guanti



Preparazione salda d'amido

- reagenti
- 2gr di amido solubile
- 100 ml di acqua distillata
- mettere in un becher l'amido aggiungere 10-20ml di acqua fredda mescolare quindi aggiungere in resto dell'acqua precedentemente riscaldata fare bollire per qualche minuto
- si ottiene un gel non può essere conservato perché viene degradato velocemente dai batteri

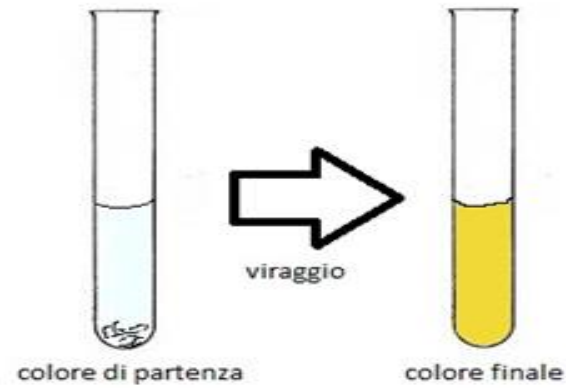
Reazione colorimetrica dell'amido

- reagenti
- acqua distillata
- salda d'amido
- acido cloridrico 37%
- preparare 4 provette in tre provette aggiungere la salda d'amido stessa quantità e portare al volume di 5 ml con l'acqua, nell'ultima mettere 5 ml di acqua
- aggiungere alle provette 2-3 gocce di soluzione diluita di liquido di Lugol
- la provetta con solo acqua rimarrà gialla quella con la salda d'amido diventeranno blu

Colore della Sostanza con Amido:



Colore della Sostanza senza Amido:



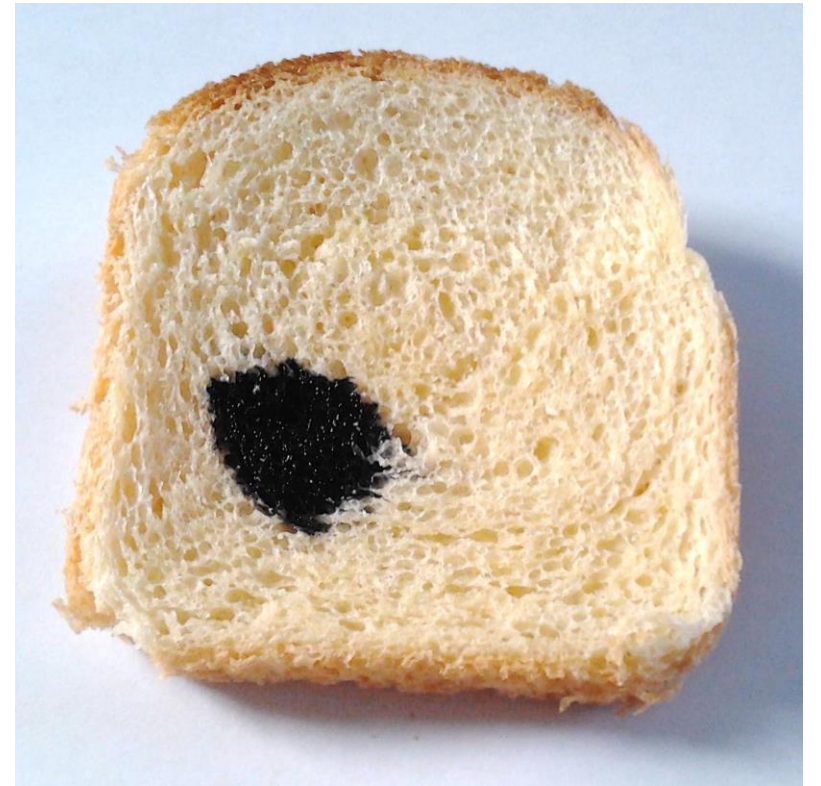
- prendere una provetta con salda d'amido e riscaldare alla fiamma si osserverà che il colore scompare per poi ricomparire quando si raffredda la soluzione



- prendere una provetta con salda d'amido e aggiungere qualche goccia di HCl si osserverà che la colorazione blu scompare per l'idrolisi dei legami
- la rottura dei legami porta alla scomparsa del colore

Reazione colorimetrica degli alimenti che contengono amido

- reagenti
- patata (fecola di patata) → amido di patata
- mollica di pane
- zucchero
- miele
- acqua distillata
- liquido di Lugol
- Si preparano 4 provette in ciascuna si aggiunge il diverso materiale mescolando si porta allo stesso volume con acqua distillata
- quindi si aggiunge qualche goccia di liquido di Lugol e si osserva che nella provetta che contiene zucchero e miele non avviene reazione colorimetrica



Verifica capacità di produrre amilasi nei microrganismi

- Reagenti
- terreno contenente amido Nutrient agar - amido solubile
- liquido di Lugol
- Materiale biologico: colture microbiche di *E. coli* e *B. subtilis*
- se la specie produce amilasi attorno alle colonie si noterà un alone chiaro che indica che il microrganismo ha degradato l'amido in destrine, maltosio e glucosio il resto della piastra rimarrà blu

- Preparare e sterilizzare il terreno di coltura
- preparare 2 piastre e dividerle a metà
- seminare solo una metà delle piastre ciascuna con microrganismi diversi,
- l'altra metà non seminata servirà da controllo



- Incubare per 48 ore a 37 gradi
- aggiungere una goccia di liquido di Lugol sulla parte seminata e una nella parte non seminata e si lascia agire per circa 1 ora quindi si osservano i risultati
- I ceppi di *B. subtilis* sono in grado di produrre l'amilasi i ceppi di *E. coli* no.

