

Enzymy biorące udział w biosyntezie i rozkładzie skrobi w roślinach

Urszula E. Dobrzyńska, Sławomir Orzechowski

Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii, SGGW

ul. Nowoursynowska 159 blok 30, 02-776 Warszawa

e-mail: orzechowski@delta.sggw.waw.pl

Słowa kluczowe: amyloza, amylopektyna, skrobia, metabolizm skrobi

Znaczenie skrobi

Jedną z wielu konsekwencji wciąż rosnącej liczby mieszkańców Ziemi jest problem związany z dostarczaniem odpowiedniej dziennej dawki energii potrzebnej do prawidłowego przebiegu metabolizmu. Wzrost zainteresowania możliwościami praktycznego wykorzystania materiałów zapasowych roślin, w tym skrobi, można tłumaczyć jako próbę częściowego rozwiązania trudnej sytuacji żywieniowej zwłaszcza w rejonach Trzeciego Świata, jak również sprostaniu żądań stawianych przez konsumentów z krajów rozwiniętych. Ponad połowę sacharydów spożywanych przez ludzi stanowi skrobia, która znalazła swoje zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu: spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym, papierniczym, tekstylnym, fotograficznym. Ostatnio można znaleźć informacje dotyczące prowadzonych badań nad użyciem tego polisacharydu do produkcji opakowań ulegających biodegradacji [36], które mogłyby stanowić dobrą alternatywę materiałów produkowanych z polistyrenu. Stosunek amylozy do amylopektyny, dwóch głównych polimerów tworzących ziarenka skrobi, wpływa na właściwości fizyczno-chemiczne skrobi. Biotechnologiczne manipulacje dotyczące metabolizmu skrobi mogą prowadzić do uzyskania najbardziej optymalnej struktury opisywanego polisacharydu. Na przykład skrobia o wysokiej zawartości amylozy wykorzystywana jest do produkcji słodyczy (słodkie gumki i żelki) czy filmów fotograficznych, a skrobia o przeważającej ilości amylopektyny znalazła zastosowanie w przemyśle papierniczym i spożywczym, w tym żywności mrożonej [14, 28].

Skrobia stanowi istotny produkt pochodzenia roślinnego. W wyniku fotosyntezy wytwarzanych jest około 2850 mln t skrobi rocznie [8]. Najważniejszym źródłem tego

polisacharydu są zboża (2050 mln t na rok), korzenie i bulwy roślin okopowych (679 mln t na rok). W krajach rozwijających się skrobia dostarcza około 35% kalorii dziennie, jednak szacuje się, że procent ten ulegnie zwiększeniu. W wielu regionach świata takich jak Afryka, czy Daleki Wschód skrobia dostarcza ponad 80% spożywanych kalorii na dobę [8].

Skrobia występuje w postaci nierozpuszczalnych ziarenek wytwarzanych w plastydach nasion, bulw czy korzeni roślin [22]. W zależności od rodzaju plastydu można wyróżnić skrobię tranzytową lub akumulacyjną [61]. Podziału tego można dokonać na podstawie pewnych cech charakteryzujących ziarenko, takich jak: wielkość, kształt, budowa wewnętrzna. Ziarenka skrobi z organów spichrzowych mają wewnętrzne semikrystaliczne pierścienie przyrostu w różnym stopniu podatne na atak enzymów i odczynników chemicznych. Formowanie się tych pierścieni może być rezultatem powtarzalnych różnicowań w syntezie skrobi. Od tych czynników zależy w dużym stopniu proces powstawania struktury skrobi [59]. Ziarenka skrobi pochodzące z liści (skrobia tranzytowa) są mniejsze niż te, które pochodzą z organów spichrzowych (skrobia akumulacyjna), mają też inną makrostrukturę. Uważa się, że ziarenka skrobi tranzytowej mają krystaliczny rdzeń z amorficzną (zewnątrzną) otoczką, w której skład wchodzi mniej rozgałęzionych polimerów glikanów. Na taką budowę ziaren ma wpływ cykl wytwarzania i wykorzystywania ziarenek skrobi: dzień / noc [5, 52]. Inne różnice dotyczą stosunku amylozy do amylopektyny. W skład skrobi tranzytowej wchodzi głównie poliglikany o wysokim stopniu rozgałęzienia, podczas gdy skrobia akumulacyjna zawiera dużą ilość poliglikanu liniowego, którego udział waha się od 11 do 37% w zależności od gatunku. U zbóż dokonano podziału na ziarenka skrobi typu A i B różniące się zarówno rozmiarami, jak i kształtem. W wypadku pszenicy, ziarenka typu A są większe (ponad 10 μm) oraz mają kształt wydłużony, w porównaniu z ziarenkami typu B, które mają kształt sferyczny (są mniejsze niż 10 μm) [13, 51]. Odpowiedni dobór ziarenek typu A lub B pozwala zoptymalizować ich wykorzystanie do określonych celów.

Skrobia, w przeciwieństwie do białek, nie ma ustalonej masy cząsteczkowej, która zależy od aktualnego stanu metabolicznego komórki. Jednostki monomeryczne mogą być dołączane lub odłączane od cząsteczki polisacharydu w zależności od energetycznego zapotrzebowania organizmu roślinnego. Rozmiar i kształt ziarenek są charakterystyczne dla rośliny, z której skrobię izolowano. W większości przypominają one sferoidy, ale niektóre mogą być ekstremalnie wydłużone – jak ma to miejsce u rośliny *Diffenbachia*. Inne mają bardziej skomplikowaną morfologię, np. granule występujące w endospermie ziarniaków pszenicy czy jęczmienia [48].

Amyloza stanowi około 30% masy cząstek skrobi. Wartość ta nie jest stała, ponieważ waha się w zależności od gatunku rośliny (od 11–35% u 51 zbadanych gatunków), odmiany (20–36% u 399 odmian kukurydzy), jak również różnych organów tej samej rośliny, stadium rozwoju fizjologicznego, warunków wzrostu i innych. Amyloza składa się głównie z liniowych łańcuchów, w których cząsteczki glukozy połączone są

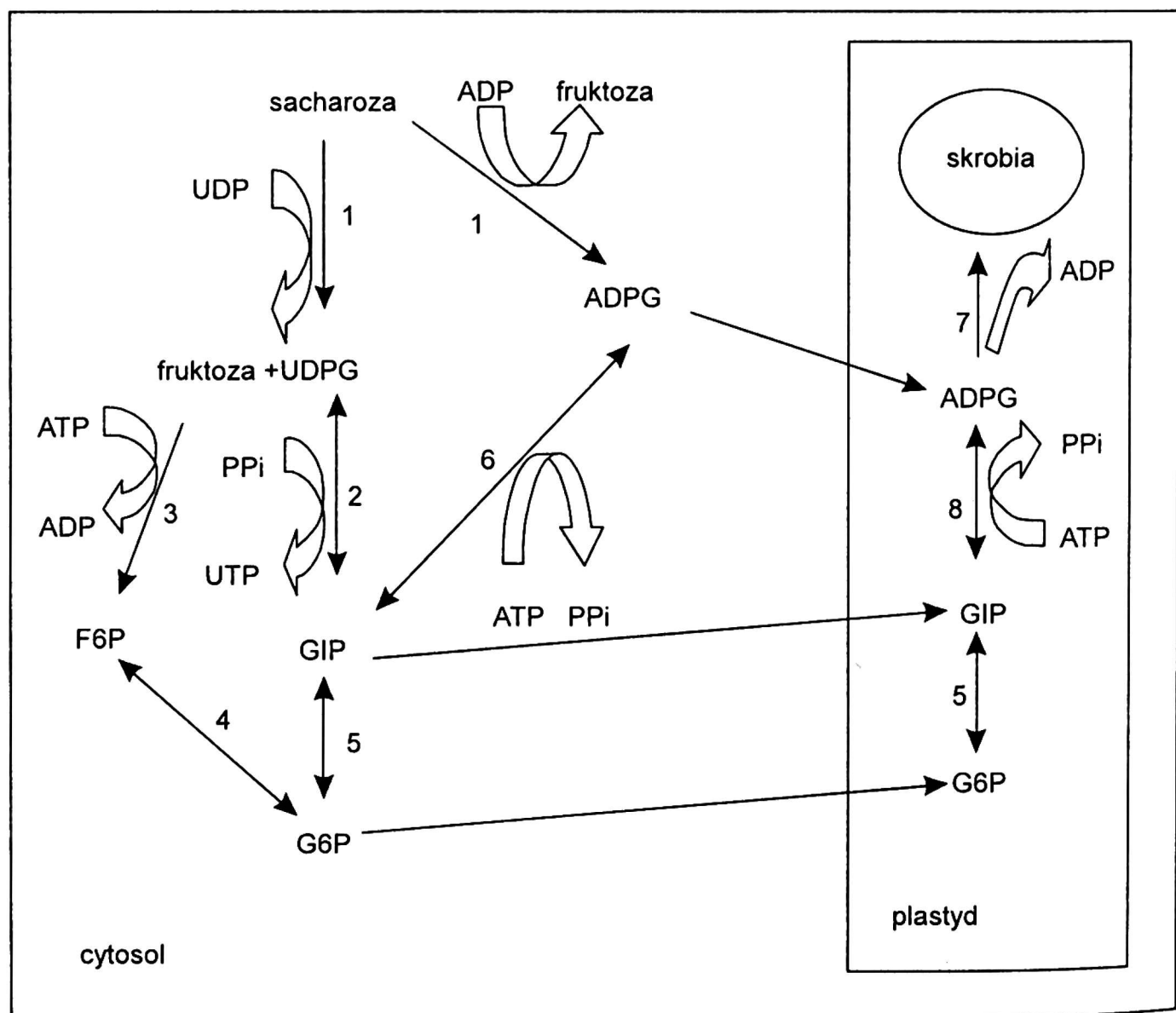
wiązaniami α -1,4-glikozydowymi. Rozgałęzienia występują na bardzo niskim poziomie tzn. około 1 rozgałęzienie na 1000 reszt glukozy [59]. Przyjmuje się, że amyloza ma heliksową konformację z sześcioma cząsteczkami α -D-glukozy przypadającymi na jeden skręt. Ten stosunkowo prosty i długi łańcuch ma masę cząsteczkową od 4000 do 15000 Da. Pojedyncza heliksa jest stabilizowana przez lizofosfolipidy i kwasy tłuszczowe [48]. Amyloza nie jest konieczna do formowania semikrystalicznej struktury ziarek, gdyż skrobia wolna od amylozy również ma pierścienie przyrostu. Stopień ich krystalizacji jest taki sam albo nawet i wyższy niż tych o przeciętnej zawartości amylozy [48].

Amylopektyna stanowi cząsteczkę, której wysoki stopień przestrzennej specyficzności warunkowany jest tylko jednym typem monomerycznych jednostek glukozowych i dwoma rodzajami wiązań [29]. Jest to polimer glukozy wysoce rozgałęziony i nierozpuszczalny w wodzie. Stanowi przeciętnie około 70% skrobi [26]. Reszty α -D-glukozy łączą się ze sobą w łańcuchu głównym i w łańcuchach bocznych wiązaniami α -1,4-glikozydowymi. Łańcuchy boczne zawierające 15–25, a nawet 30 reszt glukozy są powiązane z łańcuchem głównym wiązaniami α -(1-6)-glikozydowymi w punktach rozgałęzienia. Punkty te występują co około 12–25 reszt. W skład struktury amylopektyny wchodzi dwa typy łańcuchów poliglukanów. Pierwszy typ stanowią krótkie fragmenty reszt glukozy połączone wiązaniami α -1,4-glikozydowymi tzw. łańcuchy A, które są nierozgałęzione (jedynie rozgałęzienie występuje na ich końcu redukującym), połączone z wielorozgałęzionymi łańcuchami typu B. Rozgałęzienia te tworzone są w pozycji C-6 jednej lub wielu reszt glukozy. Około 5% takich reszt ma oba typy wiązań. Tak zbudowana amylopektyna ma pojedynczy, redukujący koniec. Rozgałęzienia łańcucha B tworzą odcinek długości około 10 nm. Rozgałęzienia te nie są tworzone przypadkowo, lecz stanowią zorganizowane przedziały. Parametry tej molekuly wynoszą: długość – 200–400 nm. (20–40 zorganizowanych grup), szerokość – około 15 nm [21, 45]. Masa cząsteczkowa amylopektyny przekracza 500 kDa, a może osiągnąć nawet wartość 100000 kDa. Wzdłuż długiej osi symetrii molekuly można wyróżnić powtarzające się odcinki długości 9–10 nm zawierające zgrupowania łańcuchów składających się z 12–20 jednostek reszt glukozy. Łańcuch składający się z około 45 reszt glukozy łączy razem dwa takie powtarzające się odcinki, a łańcuch o około 70 reszt glukozowych łączy razem trzy odcinki [48]. We frakcji amylopektyny odkryto ufosforylowanie w pozycji zarówno C-3 jak i C-6 reszt glukozowych. W skrobi pochodzącej z bulw ziemniaka około 0,5% reszt glukozy jest ufosforylowana, podczas gdy zboża mają znacznie mniej kowalencyjnie przyłączonego fosforu (mniej niż 0,01%) [30, 54].

Biosynteza skrobi

Wiadomości ogólne

W komórkach czynnych fotosyntetycznie, w procesie fotosyntezy wytwarzana jest m.in. sacharoza, która może być transportowana do komórek magazynujących skrobię. W cytozolu zostaje ona przekształcona w glukozy-1-fosforan lub glukozy-6-fosforan. Dalsze przemiany zachodzą już wewnątrz plastydu [48] (rys. 1). Zarówno amyloza, jak i amylopektyna są syntezowane z ADP-glukozy, która powstaje z glukozy-1-fosforanu i ATP. Reakcję tę katalizuje ADPGPaza, aktywowana w plastydach w obecności substratów (glukozy-1-fosforan i ATP), w reakcji tej uwolniony zostaje wolny pirofosforan. W chloroplastach substraty te wytwarzane są w trakcie fo-



Rysunek 1. Synteza skrobi z sacharozy. Powstawanie rozpuszczalnego substratu do syntezy skrobi; ADP – adenozydodifosforan, ADPG – adenozydodifosforanoglucoza, ATP – adenozydotrifosforan, F6P – fruktozo-6-fosforan, G1P – glukozy-1-fosforan, G6P – glukozy-6-fosforan, PPi – pirofosforan, UDP – urydynodifosforan, UDPG – urydynodifosforanoglucoza, UTP – urydynotrifosforan, 1 – syntaza sacharozy, 2 – UGPaza, 3 – heksokinaza, 4 – fosfoglucoizomeraza, 5 – fosfoglucomutaza, 6 – AGPaza cytozolowa, 7 – syntaza skrobiowa, 8 – AGPaza plastydowa

tosyntezy, a w wypadku plastydów nieczynnych fotosyntetycznie, muszą one być dostarczone z cytozolu [43]. Glukoza-1-fosforan może pochodzić ze szlaku pentozofosforanowego (chloroplasty), powstawać w wyniku działalności fosfoglucoizomerazy i fosfoglucomutazy [45]. Glukoza-6-fosforan może przedostawać się do amyloplasty poprzez transportery znajdujące się w błonie plastydu [43], jak ma to również miejsce w bulwach ziemniaka. We wnętrzu plastydu glukoza-6-fosforan przekształcany jest do glukoza-1-fosforanu, potem w wyniku działalności ADPGPazy powstaje ADP-glukoza, która stanowi substrat przy biosyntezie polimerów skrobi [48]. Droga prowadząca do syntezy ADP-glukozy w endospermie rozwijających się ziaren zbóż różni się od tej, która występuje w innych organach rośliny zdolnych do gromadzenia skrobi. W endospermie ADP-glukoza może powstawać w cytozolu przy udziale cytozolowej izoformy ADP-glukozy pyrofosforylasy i jak dowodzą wyniki najnowszych badań, również syntazy sacharozy (EC 2.4.1.13) [3]. Wnika ona do wnętrza plastydu przez transportery zlokalizowane w błonie. Uaktywniona cząsteczka glukozy w postaci ADP-glukozy przyłączona zostaje do nieredukującego końca istniejącego już łańcucha skrobiowego [24].

Skrobia wykazuje duże podobieństwo budowy oraz spełnianych w organizmie funkcji do glikogenu, dlatego sądzi się, że proces inicjacji syntezy obu tych polimerów również może być zbliżony. Białkiem starterowym przy tworzeniu glikogenu jest glikogenina [53]. Istnieją przypuszczenia dotyczące istnienia białka pełniącego podobne funkcje u roślin, a dla takiej hipotetycznej molekuly już zaproponowano nazwę – amylogenina. Nadal prowadzone są badania nad rozwiązaniem zagadki samego początku tworzenia się skrobi. Niektórzy autorzy zwracali uwagę na aktywność syntazy skrobiowej, która może tworzyć połączenia: białko-glukoza lub białko-poliglukoza mogące stanowić startery w biosyntezie. Inni sugerowali, że UDP-glukoza jest pewnego rodzaju prekursorem transglikozylacji akceptora białkowego. Jednak poziom UDP-glukozy jest zbyt niski w plastydach, co stawia pod znakiem zapytania wyżej przytoczone rozważania na temat systemu starterowego [46].

Proces biosyntezy skrobi można podzielić na syntezę molekuł amylopektyny i amylozy. Synteza i uorganizowanie strukturalne amylopektyny w formę ziarenka są ze sobą ściśle powiązanymi i precyzyjnie regulowanymi procesami. Musi tu mieć miejsce zarówno tworzenie połączeń α -1,4-glikozydowych, jak i wiązań α -1,6-glikozydowych. Proces ten wymaga uczestnictwa wielu różnych enzymów takich jak np. SS (syntaza skrobi) i SBE (enzymy rozgaleziające). Amyloza występuje jako pojedyncza heliksa przenikająca ziarenko skrobi, w której syntezę zaangażowany jest głównie enzym GBSS (syntaza skrobi związana z ziarenkiem).

U roślin procesy syntezy i degradacji skrobi podlegają wielu czynnikom regulującym. Prowadzone badania nad białkiem 14-3-3 pozwoliły wykazać potencjalną jego rolę jako regulatora działającego na zasadzie oddziaływania: białko-białko. Białka 14-3-3 stanowią konserwatywną rodzinę białek o charakterze kwasowym (masa molekularna wynosi 27–32 kDa) [47]. Na podstawie prowadzonych eksperymentów biochemicznych oraz analiz struktury 14-3-3, sądzi się, że enzymem docelowym oddziaływań białko-białko jest syntaza skrobi III. Redukcja ilości białka 14-3-3 związanego z powierzchnią ziarenka spowodowała znaczny wzrost akumulacji skrobi [42].

Przegląd enzymów biorących udział w syntezie skrobi

Roślinna ADPGPaza (AGPaza) (EC 2.7.7.27) to enzym o budowie tetramerycznej składający się z dwóch mniejszych i dwóch większych podjednostek kodowanych przez różne geny. Pierwszy typ podjednostek ma masę cząsteczkową pomiędzy 51–55 kDa, drugi pomiędzy 54–60 kDa [9]. Enzym ten bierze udział w szlaku biosyntezy skrobi, katalizuje powstawanie ADP-Glc z ATP i Glc-1-P [33]. Jego aktywność jest regulowana allosterycznie przez odpowiedni poziom Pi i 3-PGA. Tego typu regulacje obserwuje się w wypadku ziemniaka [19] i kukurydzy [32], natomiast w endospermie jęczmienia [31] i pszenicy [23] notuje się bardzo niską (lub w ogóle jej brak) wrażliwość enzymu na Pi i 3-PGA.

Syntaza skrobi (SS) (EC 2.4.1.21). Występują trzy rozpuszczalne izoformy: SS I, SS II, SS III, których obecność można stwierdzić w supernatancie oraz różne izoformy GBSS (granule-bound-starch-synthase) związane z ziarenkiem, których nie powinno się wykrywać we frakcji zawierających białka rozpuszczalne [11]. Izofomy: SS I, SS II, SS III katalizują reakcje syntezy amylopektyny, a GBSS – amylozy. Aktywność enzymatyczna GBSS I w trakcie tworzenia amylozy wynosi więcej niż 85% całkowitej aktywności syntaz związanych z ziarenkiem [40]. Rola GBSSI w trakcie syntezy skrobi została dobrze scharakteryzowana dzięki prowadzonym badaniom nad mutantami wolnymi od amylozy (waxy), które wykazują brak GBSSI o masie cząsteczkowej około 58–60 kDa. W ten sposób dowiedziono, że GBSSI jest odpowiedzialny za tworzenie amylozy w roślinnych organach spichrzowych [34, 45]. Istnieją pewne przesłanki sugerujące zaangażowanie tego enzymu przy wydłużaniu łańcucha poliglukozowego w amylopektynie [10]. Wyizolowano również GBSSII, której izoformy można stwierdzić w obu frakcjach (enzymów uczestniczących w metabolizmie skrobi). Masa cząsteczkowa tego enzymu wynosi 92 kDa [11]. Rozpuszczalne formy syntaz skrobi odgrywają różną rolę w trakcie syntezy amylopektyny, której ostateczny stopień dojrzałości zależy od ich aktywności [48]. Prowadzone badania nad różnymi izoformami syntazy skrobiowej pozwoliły uzyskać odpowiednie informacje o ich aktywności, a w szczególności, co na tę aktywność wpływa. Wiedza ta może zostać wykorzystana do tworzenia określonych projektów badawczych mających na celu wytworzenie ziarenek skrobi o nowych właściwościach. Dodatkowo można też próbować wpłynąć na specyficzność substratową lub zmieniać sposób przyłączania się enzymu do powierzchni ziarenka skrobi, co pociągnie za sobą zmiany fizyko-chemiczne skrobi. Prowadzone badania nad SSII i GBSSI izolowanych z bulw ziemniaka dostarczyły istotnych informacji dotyczących istnienia różnic między nimi polegających na: powinowactwie do ADP-glukozy i substratów glikanów, aktywacji przez amylopektynę, termowrażliwości, zdolności wydłużania łańcuchów poliglukozowych, wrażliwości na cytrynian [12].

Enzymy rozgałęziające (SBE – starch branching enzyme) (EC 2.4.1.18) katalizują reakcję tworzenia rozgałęzień łańcucha cukrowego charakterystycznego dla

α -amylopektyny (wiązania α -1,6-glikozydowe). Hydrolizują one wiązania α -1,4-glikozydowe w cząsteczce skrobi. Odszczepiony fragment oligosacharydu przyłączany jest do grupy hydroksylowej przy C-6 cząsteczki glukozy w łańcuchu polisacharydowym pomiędzy redukującym końcem „odcinanego” łańcucha a kolejną resztą glukozy. Rozgałęzienia te nie są tworzone przypadkowo, lecz periodycznie co 20 reszt glukozy [21, 45]. Enzymy rozgałęziające wykazują pewną specyficzną w stosunku do długości łańcucha połączonych wiązaniami α -1,4-glikozydowymi, traktowanego jako substrat reakcji. Zidentyfikowano dwie klasy SBE: SBE A i SBE B, które różnią się między sobą pewnymi właściwościami. Klasa SBE A wykazuje mniejsze powinowactwo do amylozy jako substratu niż klasa SBE B. Izoformy te również wykazują różnice między sobą w stosunku do preferencji długości przenoszonego łańcucha poliglukanowego, klasa B przenosi dłuższe fragmenty w porównaniu do klasy A [17, 44, 57].

Enzymy dysproporcjonowania (D-enzymy) (EC 2.4.1.25) katalizują dysproporcjonowanie dołączonych maltooligosacharydów poprzez wewnętrzną transglikozylację ze stopniem polimeryzacji mieszczącym się w granicach od 17 do kilku setek [55] i razem z amylopektyną tworzą cykliczne glikany o wysoko rozgałęzionej strukturze [56]. D-enzymy mogą wykorzystywać skrobię o dużej masie molekularnej zarówno w roli donora, jak i akceptora. Katalizują przenoszenie długich α -1,4-glikozydowych łańcuchów, również nawet wysoko rozgałęzionych zgrupowań tworzących charakterystyczne jednostki amylopektyny. Sądzi się, że uczestniczą one zarówno w biosyntezie, jak i degradacji ziarenka skrobi [29].

Enzymy odrozgałęziające (DBE – debranching enzyme) (EC 2.4.1.41) katalizują hydrolizę wiązań α -1,6-glikozydowych. W przeszłości uważane były głównie za enzymy związane z degradacją ziarenek skrobi, lecz ostatnio poglądy te uległy zmianie i wykazano również ich udział w tworzeniu prawidłowej struktury granulki. Spełniają ważną rolę przy biosyntezie ostatecznej formy amylopektyny. Izoformy tego enzymu określane są jako DBE typu izoamylazy (izoamylaza – EC 3.2.1.68) i DBE typu pullulanazy (również nazywane R-enzymami lub limit dekstrynazami, pullulanaza – EC 3.2.1.41). Różnice między nimi dotyczą preferencji w stosunku do substratu. Typ pullulanazy katalizuje hydrolizę wiązań α -1,6-glikozydowych w amylopektynie oraz β -limit dekstryny (glikany powstające w wyniku aktywności α -amylazy), lecz nie jest on w stanie hydrolizować glikogenu. Typ izoamylazy DBE przejawia swoją aktywność w stosunku do glikogenu, amylopektyny i β -limit dekstryn, jest nieaktywny przy hydrolizie pullulanów [4, 20]. U roślin wyższych typ izoamylazy posiada masę cząsteczkową około 340–500 kDa. Obserwacje prowadzone nad mutantami kukurydzy – *sugaryl* (*su1*) i ryżu umożliwiły dostrzeżenie roli DBE przy syntezie amylopektyny. Obecnie przyjęto, że typ izoamylazy DBE uczestniczy w procesie biosyntezy skrobi [62].

Rozkład skrobi

Wiadomości ogólne

Większość roślin syntetyzuje i degraduje skrobię w zależności od wielu czynników wewnętrznych i zewnętrznych, a także m.in. od okresu ich rozwoju. Ma to znaczenie w wypadku organów spichrzowych, takich jak bulwy czy korzenie. Proces degradacji nie jest jednakowy we wszystkich organach danej rośliny. Różnice można zaobserwować w wypadku endospermu ziarniaków, który traktowany jest jako torba ze skrobią, do wnętrza której uwalniane są enzymy hydrolizujące. Uwalniana glukoza pobierana jest przez zarodek przez cały czas jego rozwoju. W zasadzie nie można tu zaobserwować żadnego mechanizmu kontrolującego tę dystrybucję [49]. W wypadku innych roślin również mało poznano proces regulacji degradacji skrobi. Dla większości enzymów rozkładających skrobię można wyróżnić różną lokalizację ich form, co oznacza, że istnieje kilka szlaków ich degradacji [37]. Rozkład skrobi zachodzi z udziałem dwóch głównych enzymów: α - i β -amylazy. Obydwa enzymy hydrolizują rozpad wiązań α -1,4-glikozydowych, przy czym α -amylaza (endo-amylaza) działa w przypadkowych miejscach, a β -amylaza „atakuję” wyłącznie wiązania najbardziej zewnętrzne (miedzy drugim a trzecim wiązaniem α -1,4-glikozydowym) i odcina kolejne cząsteczki dwucukru maltozy od końca polimeru. Degradacja ziarenek skrobi jest inicjowana poprzez „atak” α -amylaz [2].

W wyniku oddziaływania amylaz na nierozgałęziony polimer – amylozę powstaje mieszanina glukozy i maltozy. W wypadku substratu, jakim jest amylopektyna, dodatkowym produktem są małowcząsteczkowe oligosacharydy zawierające wiązania α -1,6-glikozydowe. Ostateczny rozkład maltozy do glukozy katalizowany jest przez α -glukozydazę. W chloroplastach występuje inny zestaw enzymów rozkładających skrobię. W procesie tym bierze udział endoamylaza, hydrolizująca wiązania α -1,4-glikozydowe pomiędzy punktami rozgałęzień w amylopektynie. Występuje tu również bardzo aktywna fosforylaza (Pho1), która w obecności jonów ortofosforanowych rozkłada te krótkie łańcuchy z wydzieleniem glukozo-1-fosforanu [24].

Niedawno zidentyfikowany enzym: **wodna dikinaza α -glikanów** (dawniej – białko R1) również bierze udział w degradacji skrobi [37]. Innymi enzymami uczestniczącymi w rozkładzie skrobi są m.in. DBE oraz D-enzymy, które w zależności od organizmu roślinnego są aktywne przy biosyntezie lub degradacji [62].

Przegląd enzymów biorących udział w rozkładzie skrobi

Alfa-amylaza (EC 3.2.1.1) należy do endoamylaz, łączy się z ziarenkiem skrobi i katalizuje rozpad wiązań α -1,4-glikozydowych [24]. Ma masę cząsteczkową między 47 a 56 kDa [1]. Zaangażowana jest w indukowaną chłodem degradację ziarenek

skrobi (cold-induced sweetening) bulw ziemniaków [41]. Alfa-amylaza odgrywa główną rolę w procesie mobilizacji skrobi. Optimum pH dla α -amylazy wynosi 5,5–6,5 [6].

Beta-amylaza (EC 3.2.1.2) rozkłada amylozę do β -maltozy, „atakuje” również amylopektynę, ale „zatrzymuje” się na wiązaniach α -1,6-glikozydowych, których nie jest w stanie hydrolizować [3]. Beta-amylaza należy do egzo-amylaz i katalizuje uwolnienie β -maltozy od końca nieredukującego poliglikanu [59]. Masa cząsteczkowa tego enzymu wynosi około 60 kDa. Przyłączenie jej do powierzchni ziarenka zależy od metabolicznego stanu tkanki rośliny [35]. Uważa się, że nie wszystkie roślinne β -amylazy są zaangażowane w rozkład glikanów połączonych wiązaniami α -1,4-glikozydowymi. Wnioski te oparte są o wyniki badań wykazujących obecność β -amylazy w tkankach pozbawionych skrobi. Dodatkowo, wyniki eksperymentów prowadzonych nad wsobną linią ryżu pozbawioną β -amylaz, wykazały, że kiełkowała ona normalnie [39]. Optimum pH dla tego enzymu wynosi 6,5 (ziemniak) [60] i 5,0 (jęczmień) [63], natomiast temperatura optymalna to 40°C (ziemniak) [60] i 55°C (jęczmień) [63].

DBE – hydrolizują wiązania α -1,6-glikozydowe. W procesie degradacji skrobi uczestniczy typ pullulanazy DBE [62].

Wodna dikinaza α -glikanów (GWD – glucan, water dikinase), dawniej nazywana białkiem R1 (EC 2.7.9.4). Katalizuje transfer β -fosforanu z cząsteczki ATP do reszty glukozy poliglikanu w pozycji C-6 lub C-3. W tej reakcji γ -fosforan z ATP jest przenoszony do wody w celu wytworzenia stechiometrycznej ilości wolnego fosforanu i AMP. GWD wykazuje wysokie powinowactwo do ATP jako substratu (K_m 0,23 μ M) [38]. Enzym ten posiada masę cząsteczkową 157 kDa i jest zaliczany do enzymów związanych z ziarenkiem skrobi [25]. Antysensowna represja R1 u ziemniaka powodowała wysoką redukcję całkowitej ilości fosforu związanego ze skrobią. Wpłynęła ona również hamująco na proces powodujący powstawanie słodkości bulw ziemniaka pod wpływem przechowywania w niskich temperaturach (cold-sweetening), hamując go [24]. Ostatnio zbadano optimum pH i temperatury dla tego enzymu i wynoszą one odpowiednio: pH – 7,0 [38] oraz 35°C [27].

Fosforylaza – SP (starch phosphorylase) (EC 2.4.1.1) Katalizuje odwracalną fosforolizę α -glikanów, produkując powstawanie glukozy-1-fosforanów jako jednych z produktów reakcji [18]. W wypadku kierunku syntezy reakcji – jednostka glukozy transportowana jest z Glc-1-P do nieredukującego końca poliglikanu z uwolnieniem nieorganicznego fosforu. Można wyróżnić dwie podstawowe izoformy: Pho1 i Pho2 (plastydowa forma – Pho2 o masie cząsteczkowej ponad 100 kDa i cytozolowa – Pho1-masa cząsteczkowa około 90 kDa) [2, 16, 58]. U ziemniaka zsekwencjonowano dwa typy Pho1. Oba białka (nazwane Pho1a i Pho1b) wykazują wysoką homologię w sekwencji aminokwasów (81–84%) [13, 50].

Alfa-glukozydaza (AGL) (EC 3.2.1.20) Enzym przeprowadzający egzohydrolizę wiązań α -1,4-glikozydowych od końca nieredukującego łańcucha poliglikanów z uwolnieniem α -D-glukozy. Masa cząsteczkowa tego enzymu wynosi 97 kDa [15].

Podsumowanie

Celem pracy było zebranie i przedstawienie najważniejszych enzymów (również i innych białek) biorących udział w przemianach oraz regulacji tworzenia i rozkładu skrobi u roślin. Można zaobserwować wzrastającą ilość informacji dotyczących tego polisacharydu, nadal jednak pozostaje tajemnicą proces inicjacji tworzenia łańcuchów jednostek glukozy połączonych wiązaniami α -1,4-glikozydowymi. Cały czas trwają badania nad hipotetyczną amylogeniną. Istnieje cała sieć powiązań między współdziałającymi enzymami dwóch podstawowych szlaków przemian skrobi. Rola, jaką spełnia część tych enzymów w czasie biosyntezy i degradacji również nie jest do końca wyjaśniona. Stwarza to możliwość prowadzenia nowych badań, tworzenia mutantów o pożądanym cechach. Uzyskane informacje pozwolą ingerować w proces syntezy i rozkładu, co wpłynie na ilość i jakość pozyskiwanej skrobi.

Literatura

- [1] Acevedo E., Cardemil L. 1994. Biochemical and immunological characterisation of α -amylase isoenzymes of *Araucaria araucana*. *Physiol. Plant.* 92: 1401–1405.
- [2] Albrecht T., Greve B., Pusch K., Kossmann J., Buchner P., Wobus U., Steup M. 1998. Homodimers and heterodimers of Pho1-type phosphorylase isoforms in *Solanum tuberosum* L. as revealed by sequence-specific antibodies. *Eur. J. Biochem.* 251: 343–352.
- [3] Baroja-Fernández E., Munoz F.J., Saikusa T., Rodríguez-López M., Akazawa T., Pozueta-Romero J. 2003. Sucrose synthase catalyzes the novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants. *Plant Cell Physiol.* 44(5): 500–509.
- [4] Beatty M.K., Rahman A., Cao H.P., Woodman W., Lee M., Myers A.M., James M.G. 1999. Purification and molecular genetic characterisation of ZPU1, a pullulanase-type starch debranching enzyme from maize. *Plant Physiol.* 119: 255–266.
- [5] Beck E. 1985. The degradation of transitory starch granules in chloroplast. W: Regulation of carbon partitioning in photosynthetic tissues R.L. Heath, J. Preiss red. Baltimore, MD, Waverly Press: 27–44.
- [6] Beers E.P., Duke S.H. 1990. Characterisation of alpha-amylase from shoots and cotyledons of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 92:1154–1163.
- [7] Blenow A., Engelsens S.B., Munck L., Moller B.L. 2000 Starch molecular structure and phosphorylation investigated by a combined chromatographic and chemometric approach. *Carbohydr. Polym.* 41: 163–174.

- [8] Burrell M.M. 2003. Starch: the need for improved quality or quantity – an overview. *J. Exp. Bot.* 54: 4521–456.
- [9] Copeland L., Preiss J., 1981. Purification of spinach leaf ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 68: 996–1001.
- [10] Denyer K., Clarke B., Hylton C., Tatge H., Smith A.M. 1996. The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules. *Plant J.* 10: 1135–1143.
- [11] Edwards A., Borthakur A., Bornemann S., Venail J., Denyer K., Waite D., Fulton D., Smith A., Martin C. 1999. Specificity of starch synthase isoforms from potato. *Eur. J. Biochem.* 266: 724–736.
- [12] Edwards A., Marshall J., Sidebottom Ch., Visser R.G.F., Smith A.M. Martin C. 1995. Biochemical and molecular characterisation of a novel starch synthase from potato tubers. *Plant J.* 8(2): 283–294.
- [13] Evers A.D. 1973. The size distribution among starch granules in wheat endosperm. *Starch* 25: 303–304.
- [14] Ferguson V. 1994. High amylose und waxy corns. W: Specialty Corns, Hallauer A.R. (Red.), CRS Press: 55–77.
- [15] Frandsen T.P., Lok F., Mirgorodskaya E., Roepstorff P., Svensson B. 2000. Purification, enzymatic characterisation, and nucleotide sequence of high-isoelectric-point α -glucosidase from barley malt. *Plant Physiology* 123: 275–286.
- [16] Fukui T., Nakano K., Tagaya M., Nakayama H. 1987. W: Biochemistry of vitamin B6, Korpela T., Christen P. (red.), Birkhäuser Verlag, Basel.
- [17] Guan H.P., Praiss J. 1993. Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*). *Plant Physiol.* 102: 1269–1273.
- [18] Hanes C.S. 1940. The reversible formation of starch from glucose-1-phosphate catalyzed by potato phosphorylase. *Proc. R. Soc. (London)* B129: 174–248.
- [19] Iglesias A.A., Barry G.F., Meyer C., Bloksberg L., Nakata P.A., Greene T., Lauglin M.J., Okita T.W., Kishore G.M., Preiss J. 1993. Expression of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268(2): 1081–1086.
- [20] James M.G., Robertson D.S., Myers A.M. 1995. Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* 7: 417–429.
- [21] Kainuma K. 1988. The structure and chemistry of the starch granule. W: The biochemistry of plants, vol. 14 Carbohydrates, J. Preiss, red., San Diego, Academic Press: 141–180.
- [22] Kączkowski J. 2003. Starch and other polysaccharides – modification and applications – a review. *Pol.J. Food Nutr. Sci.* 12/53(1): 3–12.
- [23] Kleczkowski L.A., Villand P., Luthi E., Olsen O.A., Preiss J. 1993. Insensitivity of barley endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase to 3-phosphoglycerate and orthophosphate regulation. *Plant Physiol.* 101: 179–186.
- [24] Kopcewicz J., Lewak S. 1998 Podstawy fizjologii roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN: 286–289.
- [25] Lorberth R., Ritte G., Willmitzer L. Kossmann J. 1998. Inhibition of the starch-granule-bound proteins leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nat. Biotechnol.* 16: 473–477.
- [26] Martin C., Smith A.M. 1995 Starch biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 971–985.
- [27] Mikkelsen R., Baunsgaard L., Blennow A. 2004. Functional characterisation of α -glucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. *Biochem J.* 377: 525–532.

- [28] Müller-Röber B., Kossmann J. 1994. Approaches to influence starch quantity and starch quality in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17: 601–613.
- [29] Myers A. M., Morell M.K., James M.G., Ball S.G. 2000. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiology* 122: 989–997.
- [30] Nakano K., Fuki T. 1986. The complete amino acid sequence of potato α -glucan phosphorylase. *J. Biol. Chem.* 261(18): 8230–8236.
- [31] Olive M.R., Ellis R.J., Schuch W.W. 1989. Isolation and nucleotide sequences of cDNA clones encoding ADP-glucose pyrophosphorylase polypeptides from wheat leaf and endosperm. *Plant. Mol. Biol.* 12: 525–538.
- [32] Plaxton W.C., Preiss J. 1987. Purification and properties of nonproteolytic degraded ADP-glucose pyrophosphorylase from maize endosperm. *Plant Physiol.* 83: 105–112.
- [33] Preiss J., Ball K., Smith-White B., Iglesias A., Kakefuda G., Li L. 1991. Starch biosynthesis and its regulation. *Biochem Soc. Trans.* 19: 539–547.
- [34] Preiss J., Sivak M.N. 1996. Starch synthesis in sink and sources. W: Zamski E., Shaffer AA. red. Photoassimilate distribution and partitioning in plants and crops: source-sink relationships. New York: Marcel Dekker: 63–96.
- [35] Reinamnn R., Ritte G., Steup M., Appenroth K-J. 2002. Association of α -amylase and R1 protein with starch granules precedes the initiation of net starch degradation in turions of *Spirodela polyrhiza*. *Physiologia Plantarum* 114: 2–12.
- [36] Riaz M.N. 1999. Processing biodegradable packaging material from starches using extrusion technology. *Cereal Foods World* 44: 705–709.
- [37] Ritte G., Lloyd J.R., Eckermann N., Rottmann A., Kossmann J., Steup M. 2002. The starch-related R1 protein is an α -glucan, water dikinase. *PNAS* vol. 99(10): 7166–7171.
- [38] Ritte G., Lorberth R., Steup M. 2000 Reversible binding of the starch-related R1 protein to the surface of the transitory starch granules. *The Plant Journal* 21(4): 387–391.
- [39] Rorat T., Sadowski J., Grellet F., Daussant J.I., Delseny M. 1991. Characterisation of cDNA clones of rye endosperm β -amylase and analysis of β -amylase deficiency in rye mutant lines. *Theor. Appl. Genet.* 83: 257–263.
- [40] Sagisaka S., Akita T., Akase T., Matsumoto K., Nozaki K., Matsui H., Ito H., Honma M. 1999. Trafficking of starch synthase from the cytosol to functional sites in younger and older proplastids in developing stolons of potato. *J. Plant. Physiol* 154(3): 310–318.
- [41] Sauter J.J., Elle D., Witt W. 1998. Starch granule bound endoamylase and its possible role during cold acclimation of parenchyma cells in poplar wood (*Populus* \times *canadensis* Moench 'robusta'). *J. Plant Physiol.* 153: 739–744.
- [42] Sehnke P.C., Chung H-J., Wu K., Ferl R.J. 2001. Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins. *PNAS* 98(2) 765–770.
- [43] Shannon J.C., Pien E-M., Cao P., Liu K-C. 1998. Brittle-1, an adenylate translocator, facilitates transfer of extraplastidial ADP-glucose into amyloplasts of maize endosperm. *Plant Physiol.* 117: 1235–1252.
- [44] Smith A.M. 1988. Major differences in isoforms of starch branching enzyme in embryos of round and wrinkled seeded peas (*Pisum sativum* L.). *Planta* 175: 270–279.
- [45] Smith A.M. 2001. The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules* 2: 335–341.
- [46] Smith A.M., Denyer K., Marin C.R. 1995. What controls the amount and structure of starch in storage organs? *Plant Physiol.* 107: 673–677.

- [47] Smith A.M., Denyer K., Martin C. 1997. The synthesis of the starch granule. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 67–87.
- [48] Smith A.M., Martin C. 1993. Starch biosynthesis and the potential for its manipulation. W: Biosynthesis and manipulation of plant products, plant biotechnology Series, Vol. 3, D. Grierson red. (Glasgow: Blackie Academic and Professional Publishers): 1–54.
- [49] Smith A.M., Zeeman S.C., Thorneycroft D., Smith St.M. 2003. Starch mobilization in leaves. *J. Exp. Bot.* 54(382): 577–583.
- [50] Sonnewald U., Basner A., Greve B., Steup M. 1995. A second L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: cloning, antisense inhibition and expression analysis. *Plant Mol. Biol.* 27: 567–576.
- [51] Stark J.P., Lynn A. 1992. Starch granules large and small. *Biochem. Soc. Trans.* 20: 7–12.
- [52] Steup M., Robenek H., Melkonian M. 1983. In vitro degradation of starch granules isolated from chloroplasts. *Planta* 158: 428–436.
- [53] Stryer L. 1999. Biochemia. Wydawnictwo Naukowe PWN: 625.
- [54] Tabata S., Nagata K., Hizukuri S. 1975. Studies on starch phosphates Part 3. On the esterified phosphates in some cereal starches. *Starch Staerke* 27: 333–335.
- [55] Takaha T. 1996. Isolation of disproportionating enzyme (EC 2.4.1.25) from potato and investigation of its role in starch metabolism. Ph.D. Thesis, University of Edinburgh, UK.
- [56] Takaha T., Yanase M., Takata H., Okada S., Smith S.M. 1996. Potato D-enzyme catalyzes the cyclisation of amylose to produce cycloamylose, a novel cyclic glucan. *J. Biol. Chem.* 271: 2902–2908.
- [57] Takeda Y., Guan H.P., Preiss J. 1993. Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydr. Res.* 240: 253–263.
- [58] Tanizawa K., Mori K., Tagaya M., Fukui T. 1994. W: Molecular aspects of enzyme catalysis (Fukui T., Soda K. red.), Kodansha and VCH, Tokyo/Weinheim/New York/Basel/Cambridge.
- [59] Van Damme E.J.M., Hu J., Barre A., Hause B., Baggerman G., Rouge P., Peumans W.J. 2001. Purification, characterisation, immunolocalisation and structural analysis of the abundant cytoplasmic β -amylase from *Calystegia sepium* (hedge bindweed) rhizomes. *Eur. J. Biochem.* 268(23): 6263–6273.
- [60] Vikso-Nielsen A., Christensen T.M.I.E., Bojko M., Marcussen J. 1997. Purification and characterisation of a phloem-specific beta-amylase from leaves of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.* 99(1): 190–196.
- [61] Visser R.G.F., Jacobsen E. 1993. Towards modifying plants for altered starch content and composition. *Trends Biotechnol.* 11: 63–68.
- [62] Wattedled F., Ral J-P., Dauvillee D., Myers A.M., James M.G., Schlichting R., Giersch Ch., Ball S.G., D'Hulst Ch. 2003. STA11, a *Chlamydomonas reinhardtii* locus required for normal starch granule biogenesis, encodes disproportionating enzyme. further evidence for a function of α -1,4 glucanotransferases during starch granule biosynthesis in green algae. *Plant Physiology* 132: 137–145.
- [63] Yoshigi N., Okada Y., Maeba H., Sahara H., Tamaki T. 1995 Construction of a plasmid used for the expression of a sevenfold-mutant barley beta-amylase with increased thermostability in *Escherichia coli* and properties of the sevenfold-mutant beta-amylase. *J. Biochem.* 118(3): 562–567.

Enzymes involved in biosynthesis and degradation of starch in the plants

Key words: amylose, amylopectin, starch, starch metabolism

Summary

Starch is an insoluble carbohydrate reserve stored in plastids, consisting of two homopoliglucans – amylose and amylopectin. It is the major source of glucose units in plants, moreover plays an important role in the human and animal diets. There is an increasing number of possibilities for nonfood industry of using starch as a natural raw material. For this reasons, understanding of starch biosynthesis and mobilization becomes more needed. As a result of different studies carried out on this subject, nowadays it is known that many proteins, mostly enzymes, are involved in formation and degradation of starch. Some of them are bounded to the starch granula, some occur in close to the surface. The aim of this work was to present the most important proteins that are involved in starch metabolism.