

Instrukcja do ćwiczenia 1 z enzymologii IIICH-DI

Wykrywanie aktywności enzymatycznej w materiale biologicznym

Enzymy są to wielkocząsteczkowe biokatalizatory przeprowadzające reakcje chemiczne, którym towarzyszy spadek energii swobodnej układu. Wpływają jedynie na takie procesy chemiczne, które są termodynamicznie możliwe, przyspieszając osiągnięcie stanu końcowej równowagi chemicznej, do którego dąży dana reakcja. Enzymy obniżają wymaganą ilość energii aktywacji, dzięki czemu zwiększa się szybkość reakcji. Charakteryzują się one wysoką specyficnością działania i dużą aktywnością katalityczną. Przyspieszają co najmniej milionkrotnie reakcje chemiczne, które w warunkach braku enzymu zachodziłyby tak wolno, że produkty i sama reakcja byłyby niezauważalne. Enzymy posiadają zdolność przyłączania substratów i miejscowego zwiększania ich stężenia, przez co przyspieszają przebieg katalizowanej reakcji. Zazwyczaj cząsteczka białka enzymatycznego jest wielokrotnie większa (nawet o kilka rzędów wielkości) od cząsteczki substratu, co sugeruje istnienie ograniczonego obszaru – centrum katalitycznego – bezpośrednio wiążącego substrat. Jednocześnie działają specyficznie zarówno pod względem rodzaju katalizowanej reakcji, jak i substratów.

Enzymy nazywa się w dwojaki sposób. Pierwszy sposób to dwuczęściowa nazwa enzymu, gdzie część pierwsza, zakończona przyrostkiem ”-aza”, określa typ katalizowanej reakcji, a druga – substrat(y) reakcji. Jest to raczej historyczny i potoczny sposób nazewnictwa. W celu ujednolicenia i uniknięcia pomyłek wprowadzono system nomenklatury EC. Podstawą tej klasyfikacji jest typ i mechanizm katalizowanej przez nie reakcji oraz używane substraty. Każdy enzym posiada swój kod o postaci: EC xx.xx.xx.xx, gdzie litery x oznaczają cyfry arabskie. Symbol EC zaznacza, że dalsza część kodu to numer w międzynarodowym katalogu enzymów (ang. Enzyme Catalogue). Sam numer składa się z 4 członów: pierwszy określa główną klasę, charakteryzującą typ katalizowanej reakcji; drugi określa podklasę, charakteryzującą zazwyczaj rodzaj wiązania lub grupy, której dotyczy reakcja; trzeci określa podpodklasę, która może zawierać: dokładniejszą specyfikację wiązania, grupę związków do której należy substrat, nazwę donora lub akceptora; czwarty wskazuje na określony enzym przez podanie nazwy substratu reakcji.

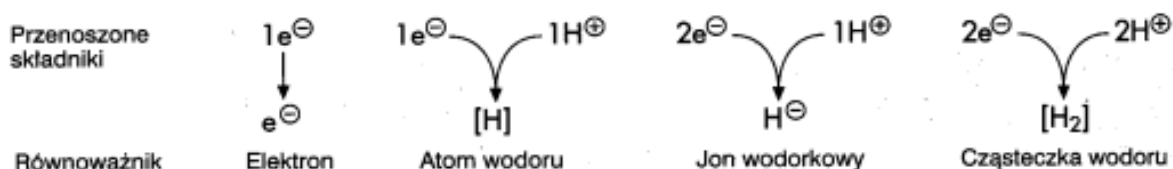
System zawiera 6 klas enzymów i katalizowanych przez nie reakcji (rys. 1):

- 1 – oksydoreduktazy – katalizują reakcje utleniania i redukcji (redox; patrz punkt III-3)
- 2 – transferazy – katalizują reakcje przenoszenia grup funkcyjnych między cząsteczkami lub w obrębie jednej cząsteczki
- 3 – hydrolazy – katalizują reakcje rozpadu pod wpływem wody (hydrolizy)
- 4 – liazy – katalizują reakcje rozpadu bez udziału cząsteczek wody
- 5 – izomerazy – katalizują reakcje zmian położenia grup chemicznych z zachowaniem szkieletu (izomeryzacja)
- 6 – ligazy – katalizują reakcje tworzenia wiązań kowalencyjnych

Klasa	Typ reakcji	Najważniejsze podklasy
1. Oksydoreduktazy	○ = równoważnik redukcyjny A_{red} + B_{ox} ⇌ A_{ox} + B_{red}	dehydrogenazy, oksydazy, peroksydazy, reduktazy, monooksygenazy
2. Transferazy	A-B + C ⇌ A + B-C	C ₁ -transferazy, glikozylotransferazy, aminotransferazy, fosfotransferazy
3. Hydrolazy	A-B + H₂O ⇌ A-H + B-OH	esterazy, glikozydazy (amylazy), proteazy, nukleazy, fosfatazy, lipazy, inwertazy
4. Liazy (syntazy)	A + B ⇌ A-B	liazy C-O liazy C-C liazy C-N liazy C-S
5. Izomerazy	A ⇌ Iso-A	epimerazy izomerazy <i>cis-trans</i> transferazy wewnątrzcząsteczkowe
6. Ligazy (syntetazy)	A + B + XTP ⇌ A-B + XDP X = A, G, U, C	syntetazy C-O syntetazy C-C syntetazy C-N syntetazy C-S

Rys. 1. Klasy i podklasy enzymów w systemie EC oraz schematy katalizowanych reakcji (Koolman i Roehm, Color Atlas of Biochemistry).

Klasa 1 Oksydoreduktazy – katalizują wiele istotnych reakcji komórkowych, w których dochodzi do łączenia wodoru z tlenem. Oksydoreduktazy katalizują przeniesienie równoważników redukcyjnych między dwoma układami redoks. Termin równoważnik redukcyjny określa kombinację elektronów i protonów, które pojawiają się w procesach redoks (Rys. 2)



Rys. 2. Równoważniki redukcyjne wykorzystywane w reakcjach redoks zachodzących w żywych organizmach.

W układach biologicznych reakcje utleniania wodoru nie zachodzą na wodorze cząsteczkowym, tylko wodorze związanym z różnego rodzaju koenzymami, głównie nikotynamidoadeninowymi. Koenzymy z kolei pobierają wodór z substratów reakcji podlegających utlenianiu (cukry, kwasy tłuszczowe). Biologiczne utlenianie wodoru polega więc na przeniesieniu elektronów nie wprost z wodoru na tlen, ale przez wiele biologicznych układów oksydoredukcyjnych. Pod względem mechanizmu działania oksydoreduktazy dzielimy na:

- oksygenazy,
- dehydrogenazy,
- oksydazy,
- hydroperoksydazy.

Oksygenazy katalizują proces wbudowywania O_2 w cząsteczkę. Wyróżnia się oksygenazy właściwe i hydroksylujące, najczęściej .

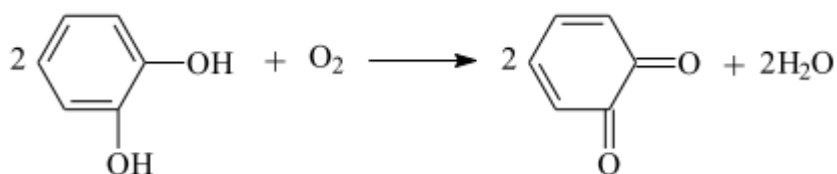
Dehydrogenazy katalizują odrywanie atomów wodoru od utlenianego substratu i przenoszą je na inne enzymy czy związki pośrednie, a nie mają zdolności przenoszenia elektronów bezpośrednio na tlen. Różnią się one rodzajem koenzymów, które są właściwymi chwytnikami atomów wodoru.

Oksydazy aktywują atomy tlenu do przyjęcia elektronów oderwanych od utlenianego substratu i katalizują połączenie powstałych jonów tlenkowych z protonami na cząsteczkę H_2O lub H_2O_2 . Enzymy te przenoszą wodór bezpośrednio na tlen atmosferyczny. Substratem są często mono- i polifenole.

Duże znaczenie praktyczne ma oksydoreduktaza o-difenol:tlen (EC.1.10.3.1.) zwana potocznie **oksydazą fenolową**, oksydazą polifenolową, tyrozynazą lub katecholazą. Enzym ten odpowiedzialny jest za zjawisko tzw. brązowienia enzymatycznego. Polega ono na przybieraniu ciemnej brązowej barwy przez różne produkty spożywcze: gruszki, banany, ziemniaki, pieczarki, sałata, krewetki, homary, powodując obniżenie ich wartości. Niemniej jednak efektem działania tego enzymu jest także kolor czarnej herbaty, koniaku, kawy, czekolady czy chleba razowego.

W obecności tlenu zawartego w powietrzu, enzym katalizuje pierwszą fazę biochemicznej przemiany związków fenolowych do chinonów, które są słabo zabarwione, ale następnie polimeryzują do nierozpuszczalnych polimerów o ciemnej barwie nazywanych melaninami lub tworzą z niezmienionymi fenolami intensywnie barwne kompleksy z przeniesieniem ładunku kompleksy "*charge-transfer*", kompleksy CT).

Typową reakcją katalizowaną przez ten enzym jest utlenianie pirokatechiny (Rys. 2). Działaniu enzymu ulega również fenol jednowodorotlenowy, przy czym najpierw tworzy się pirokatechina. Oksydaza fenolowa jest metaloproteina i zawiera miedź, która przyjmuje elektrony od dwufenoli i przekazuje na tlen cząsteczkowy.

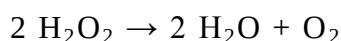


Rys. 2 Utlenianie pirokatechiny przez oksydazy

Hydroperoksydazy obejmują dwie podgrupy enzymów: peroksydazy (przeważają w tkankach roślinnych) i katalazy (w tkankach zwierzęcych). W wyniku naturalnych procesów metabolicznych w komórkach pojawiają się wolne rodniki. W zbyt wysokim stężeniu są one niebezpieczne dla struktur komórkowych (powodują niekontrolowane utlenianie m. in. Białek, kwasów tłuszczowych) dlatego ich poziom musi być ściśle kontrolowany. Do enzymów odpowiedzialnych za kontrolę puli reaktywnych form tlenu należą właśnie peroksydazy i

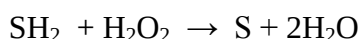
katalazy. Obydwie podgrupy powodują rozkład nadtlenu wodoru. Peroksydaza rozkłada H_2O_2 , a powstający tlen utlenia jakąś substancję, natomiast katalaza powoduje rozkład nadtlenu wodoru niezależnie od obecności akceptora tlenu.

Katalazy są szeroko rozpowszechnionymi enzymami: występującymi u wszystkich organizmów tlenowych, zarówno u zwierząt, jak i u roślin i bakterii. Katalizują reakcję rozkładu nadtlenu wodoru do tlenu i wody według równania:



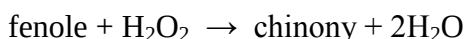
Jest to szczególny przypadek reakcji hydroperoksydazowej, w której H_2O_2 jest jednocześnie donorem i akceptorem wodoru. Wykrywanie katalazy polega na tym, że tlen uwolniony w reakcji dysproporcjonowania H_2O_2 katalizowanej przez katalazę, wydzielając się z roztworu powoduje jego silne pienie.

Peroksydazy są enzymami bardzo rozpowszechnionym w roślinach. Ich działanie związane jest z obecnością nadtlenu wodoru. Enzymy te redukują nadtlenek wodoru równocześnie utleniając (odwodnorodując) różnego rodzaju substraty. Reakcję tę można zapisać:

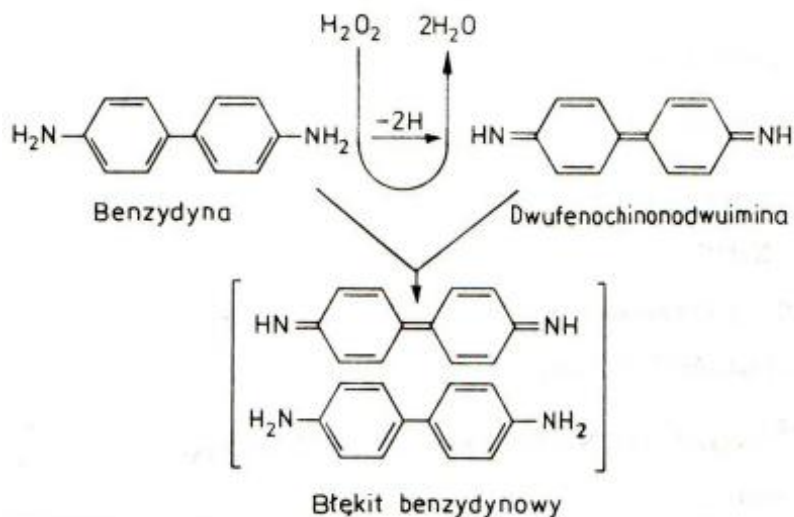


gdzie SH_2 i S to, odpowiednio, substrat w stanie zredukowanym i utlenionym.

Nadtlenek wodoru nie jest więc rozkładany z wydzielaniem tlenu, lecz wykorzystywany przez enzym w reakcjach utleniania substratów (np. fenoli):



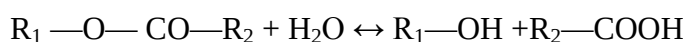
Charakterystyczną reakcją pozwalającą na wykrywanie peroksydaz jest reakcja z benzydynam, która w obecności H_2O_2 ulega utlenieniu przez peroksydazę do błękitu benzydynowego, zgodnie z reakcją:



Klasa 3 Hydrolazy – to grupa enzymów katalizujących proces rozpadu substratu z udziałem cząsteczek wody. Nazwę systematyczną tworzy się dodając do terminu hydrolaza nazwę substratu, np. hydrolaza acetylo-CoA. Nazwy potoczne mają przeważnie końcówkę –aza dodaną do nazwy substratu, np. ureaza lub też są to nazwy zwyczajowe, np. pepsyna, trypsina, papaina.

Najważniejsze podklasy hydrolaz działają na wiązania:

- estrowe (3.1) – np. lipazy katalizują hydrolizę tłuszczów do glicerolu i kwasów tłuszczowych według schematu:



Lipazy wykazują niewielką specyficzność i katalizują rozkład estrów, utworzonych przez kwasy o krótkim i długim łańcuchu, nasycone i nienasycone oraz alkohole mające łańcuch krótki lub długi, jedno- lub wielowodorotlenowe

Do tej klasy hydrolaz należy kwaśna fosfataza przeprowadzająca defosforylację estrów fosforanowych zgodnie ze schematem:

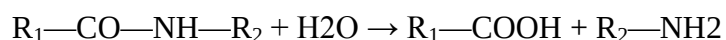


Poza naturalnymi substratami, hydrolazy te rozszczepiają także estry fosforanowe fenoli, np. p-nitrofenylofosforan, które dzięki reakcji barwnej mogą służyć do wykrywania tych enzymów.

- glikozydowe (3.2) – tzw. hydrolazy glikozydowe, rozszczepiają wiązania glikozydowe glikozydów, kilku- i wielocukrów. Różnią się między sobą swoistością działania, ale zawsze hydrolizują tylko cukry w formie D. Wykazują ścisłą specyficzność wobec konfiguracji atakowanego wiązania. Najpowszechniej występują **amylazy** – enzymy przeprowadzające hydrolizę skrobi. W organizmach zwierząt najważniejsze są α -amylazy (np. amylaza trzustki i amylaza śliny), które atakują w sposób chaotyczny wiązania α -1,4-glikozydowe z wyjątkiem wiązania maltozy. Produktem hydrolizy jest mieszanina dekstryn, maltozy i glukozy. Najprostszym sposobem na wykrycie aktywności amylaz jest reakcja z jodem. I w KI w obecności skrobi tworzy ciemne fioletowo-niebieskie zabarwienie. Przebieg procesu degradacji skrobi można śledzić obserwując zmianę barwy roztworu skrobi traktowanego jodem od niebieskiej (kompleks ze skrobią), poprzez fioletową, czerwoną (kompleks z erytrodekstrynami) do bezbarwnej (utworzenie cukrów o niskim ciężarze cząsteczkowym). W czasie procesu rośnie zawartość cukrów redukujących, produktów hydrolizy skrobi i określając ich zawartość można śledzić przebieg reakcji. W miarę jak skrobia jest hydrolizowana przez enzym barwa zanika aż do całkowitego odbarwienia w tzw. punkcie achromowym.

Innym przykładem hydrolaz glikozydowych jest **inwertaza**, nazywana także sacharazą lub β -fruktofuranowydazą, która hydrolizuje wiązanie fruktofuranozydowe pomiędzy fruktozą i glukozą w cząsteczce sacharozy. Aktywność enzymu można monitorować na podstawie ilości pojawiających się w mieszaninie cukrów redukujących, za pomocą odczynnika Benedicta, Fehlinga lub kwasu dinitrosalicylowego (DNS).

- peptydowe (3.4) – hydrolazy peptydowe rozszczepiają wiązania peptydowe zgodnie z reakcją:



Większość proteaz to enzymy trawienne występujące w przewodzie pokarmowym. Istnieje kilka podziałów tej grupy enzymów: w zależności od tego, czy miejsce przecięcia jest wewnątrz cząsteczki białka czy odczepiane są aminokwasy z końców cząsteczki wyróżniamy odpowiednio endo- i egzopeptydazy. Inny podział uwzględnia budowę miejsca aktywnego – tu wyróżniamy m. in. proteazy serynowe, metaloproteazy.

Celem ćwiczenia jest wykazanie aktywności enzymatycznej katalazy, peroksydazy, oksydazy, amylazy oraz inwertazy w przygotowanych ekstraktach.

UWAGA!! Na zajęcia należy przynieść 1 dużego ziemniaka, 1 jabłko, 1 banana oraz 5 dużych pieczarek.

Odczynniki:

1. 1% fenol
2. 1% pirokatechina
3. 1% rezorcyna
4. 1% pirogalol
5. 4% benzydyna w kwasie octowym
6. 3% nadtlenuk wodoru
7. roztwór I w KI
8. 1% skrobia w 0,1M buforze octanowym

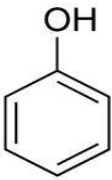
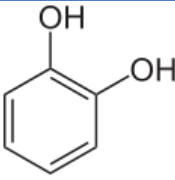
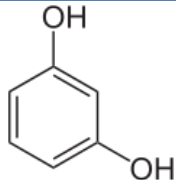
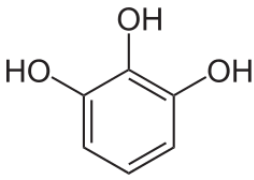
Grupa dzieli się na 4 zespoły. Każdy zespół przygotowuje ekstrakt z innego materiału i wykonuje na nim wszystkie doświadczenia przewidziane w ćwiczeniu.

II. Przygotowanie ekstraktów enzymatycznych

1. Umyty i obrany ziemniak zetrzeć na tarce. Dolać 100 ml wody i wytrząsać przez 10 minut. Po tym czasie przesączyć miążgę do zlewki przez gazę, odczekać aż skrobia opadnie na dno i delikatnie zlać wodny ekstrakt enzymu. Analogicznie postąpić z jabłkiem.
2. Utrzeć w moździerzu rozdrobnione, obrane 4 pieczarki dolewając stopniowo 100ml wody. Całość wytrząsać przez 10 minut, następnie przesączyć przez gazę. Analogicznie postąpić z bananem.
3. Ekstrakty po przygotowaniu od razu umieścić na lodzie aby zapobiec proteolitycznej degradacji enzymów.
4. Ok. 50ml ekstraktu z ziemniaka przelać do falkona podpisać (również nr grupy) i zamrozić.
5. Połowę z każdego ekstraktu wstawić do łaźni wodnej na 15 min na 90°C.

III. Wykrywanie aktywności enzymatycznej

1. Katalaza – do dwóch probówek wlać po 1ml 3% wody utlenionej, następnie do jednej dodać kilka kropli ekstraktu enzymatycznego świeżego a do drugiej podgrzanego. Zanotować wyniki.
2. Oksydaza polifenolowa – do jednego szeregu probówek (czterech) wprowadzić 2 ml ekstraktu enzymatycznego świeżego a do drugiego szeregu tyle samo ekstraktu podgrzanego. Następnie dodać po 5 kropli fenoli wg schematu poniżej. Zanotować wyniki.

	1	2	3	4
substrat	fenol	pirokatechina	rezorcyna	pirogallol
Wzór strukturalny				
Ekstrakt świeży (+/-) obserwacje				
Ekstrakt podgrzany (+/-) obserwacje				

3. Peroksydaza – do jednego szeregu probówek wprowadzić 2 ml ekstraktu enzymatycznego świeżego a do drugiego szeregu tyle samo ekstraktu podgrzanego. Do probówek dodać po 5 kropli substratów wg schematu poniżej a następnie do wszystkich 10 kropli 3% wody utlenionej. UWAGA! Wodę utlenioną należy dodać bezpośrednio po każdym z fenoli!! Zanotować wyniki.

	1	2	3	4	5
substrat	fenol	pirokatechina	rezorcyna	pirogallol	benzydyna
Ekstrakt świeży (+/-) obserwacje					
Ekstrakt podgrzany (+/-) obserwacje					

4. Amylaza – wykonać reakcję zgodnie ze schematem poniżej (w kolejności od góry do dołu). Zanotować czas osiągnięcia punktu achromowego.

próbówki	1	2	3
1% skrobia	1ml	1ml	1ml
I w KI	250μl	250μl	250μl
woda	1ml	–	–
Ekstrakt świeży	–	1ml	–
Ekstrakt podgrzany	–	–	1ml
Obserwacje			