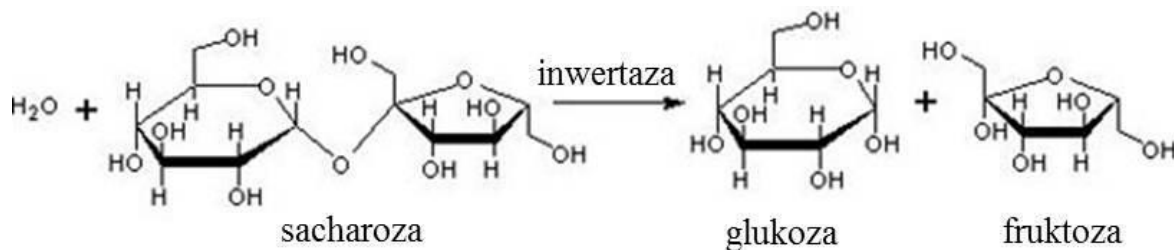


ENZYMOLOGIA
LABORATORIUM NR 2

CZYNNIKI WARUNKUJĄCE AKTYWNOŚĆ INWERTAZY

Inwertazy (E.C. 3.2.1.26) zwane także β -D-fruktofuranozydazami lub sacharazami, są enzymami z grupy hydrolaz katalizującymi rozkład sacharozy do fruktozy i glukozy:



Inwertazy występują u wielu organizmów: u grzybów np. drożdży pozwalają na hydrolizę sacharozy do łatwo przyswajalnych cukrów prostych, u ssaków występują na wewnętrznej powierzchni komórek nabłonka wyściełającego jelito cienkie, a u owadów np. pszczoł występują w ślinie gdzie biorą udział w przetwarzaniu cukru z nektaru kwiatowego do cukrów prostych. U roślin natomiast cukry transportowane są w tkankach w postaci sacharozy, która jest chemicznie niereaktywna i nie ulega reakcjom redoks, aby uzyskać monocukry, które są głównym źródłem energii niezbędne są inwertazy hydrolizujące ten dwucukier.

Inwertazy grzybowe niekiedy mają dodatkowo zdolność syntezy polimerów cukrowych opartych na fruktozie, tzw. fruktooligosacharydów. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* znaleziono dwie formy inwertazy. Obydwie formy kodowane są przez jeden gen (SUC2), z którego powstaje jeden transkrypt, jednak translacja rozpoczyna się w dwóch różnych miejscach, od dwóch różnych kodonów start:

- forma „zewnątrzna” – związana ze ścianą komórkową, na końcu N posiada dwa dodatkowe aminokwasy, posiada sekwencję sygnałową eksportu na zewnątrz komórki więc w trakcie syntezy przechodzi przez reticulum endoplazmatyczne, gdzie ulega silnej glikozylacji (50% masy stanowi mannoza). Masa cząsteczkowa enzymu wynosi ok. 270 kDa, zawiera cząsteczki cysteiny
- forma „wewnętrzna” – cytoplazmatyczna, nie posiada dodatkowych aminokwasów na N końcu i jest syntetyzowana na wolnych rybosomach w cytoplazmie. Masa cząsteczkowa 135 kDa, nie zawiera cysteiny

Mechanizm działania enzymu polega na katalizie nukleofilowej (przez asparaginian w pozycji 23) i kwasowo-zasadowej (glutaminian – 204). Podstawienie asparaginy w miejsce asparagnianu w pozycji 23 powoduje całkowitą deaktywację inwertazy, podczas gdy podstawienie alaniny w miejsce glutaminianu (204) zmniejsza aktywność enzymu niemal 3000 razy. Enzymy z tej grupy potrafią hydrolizować także inne cukry, np. trehalozę, laktozę, czy rafinozę jednak szybkość takich reakcji jest 10-krotnie mniejsza niż sacharozy.

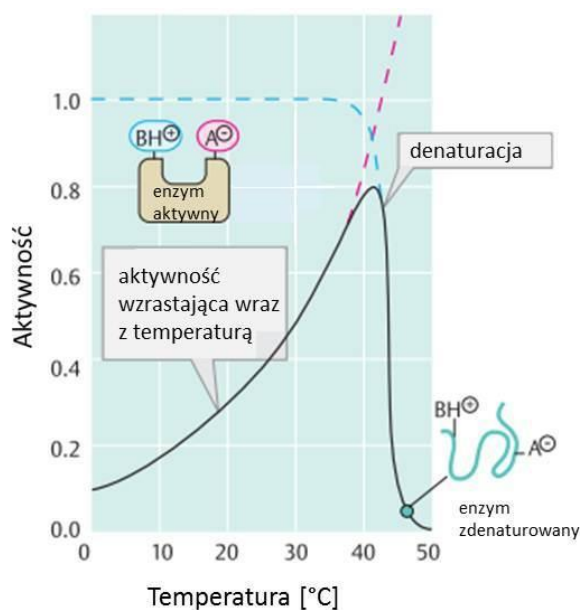
Inwertazy są wykorzystywane w przemyśle spożywczym do produkcji czekoladek z półpłynnym nadzieniem. Podczas produkcji nadzienie, którego głównym składnikiem jest sacharoza występuje w postaci stałej i jest pokrywane warstwą czekolady. Następnie takie pralinki dojrzewają przez kilka tygodni. w trakcie których w wyniku działania inwertazy dodanej w procesie produkcji, sacharoza rozkładana jest do fruktozy i glukozy, które chłonąc wilgoć ze środowiska powodują w efekcie upłynnienie nadzienia.

Białka i enzymy cytoplazmatyczne stosunkowo łatwo wyizolować. Nie dość, że do uwolnienia ich do roztworu wystarczy zniszczenie ścian i błon komórkowych to dodatkowo są one rozpuszczalne w roztworach wodnych. Niestety enzymy błonowe i te związane ze ścianami komórkowymi wymagają większych zabiegów, aby przeprowadzić na nich testy aktywności. Metody pozyskiwania takich enzymów poza pierwszym etapem dezintegracji komórek poprzez mielenie, ucieranie czy lizowanie zawierają etapy polegające na oczyszczeniu uzyskanego homogenizatu. Najprostszymi metodami oddzielenia białek od innych składników komórkowych jest ich wytrącenie z roztworu np. poprzez wysalanie, wytrącanie przy pomocy rozpuszczalników organicznych (np. acetonu), czy podwyższonej temperatury. Wytrącone białka można rozpuścić w odpowiednim buforze i poddawać analizom.

Enzymy są białkami posiadającymi mniej lub bardziej specyficzną aktywność katalityczną. Oprócz czynników środowiskowych zmieniających właściwości i aktywność wszystkich białek takich jak temperatura, zasolenie, pH na aktywność biokatalityczną wpływa stężenie substratu, stężenie enzymu, obecność aktywatorów i inhibitorów.

1. Wpływ temperatury na aktywność enzymów

Początkowo wraz ze wzrostem temperatury szybkość reakcji również wzrasta, aż do momentu osiągnięcia maksymalnej prędkości w temperaturze optymalnej dla danego enzymu. Po przekroczeniu wartości temperatury optymalnej szybkość reakcji gwałtownie spada, głównie na skutek denaturacji cieplnej białkowej części enzymu (Rys. 1).

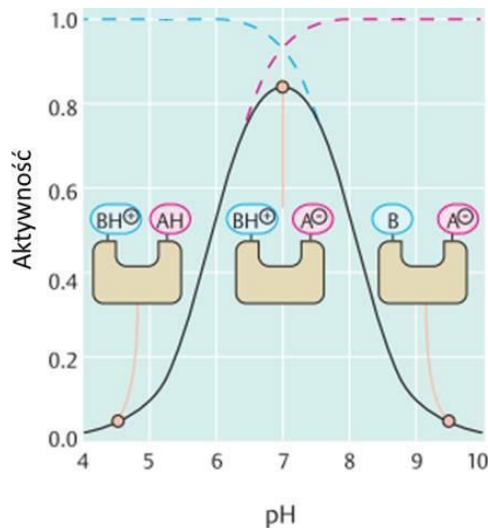


Rys. 1. Zależność aktywności enzymu od temperatury (Koolman i Roehm, Color Atlas of Biochemistry).

Optymalna temperatura jest charakterystyczna zarówno dla enzymu, jak i organizmu, z którego pochodzi. Dla większości ssaków enzymy najlepiej działają w temperaturze ok. 37°C, natomiast dla roślin kiełkujących wczesną wiosną będą to temperatury ok. 10°C. Dla większości enzymów temperaturą graniczną jest 65-70°C, w której dochodzi do denaturacji struktur białkowych, enzym traci swoją konformację i możliwość działania. Niemniej jednak istnieją enzymy, które są w stanie zachować aktywność nawet po zagotowaniu (np. enzymy bakterii żyjących w gorących źródłach, tzw. termofili). Najwyższa temperatura, w której enzym nadal prawidłowo funkcjonuje jest miarą jego termostabilności.

2. Wpływ pH na aktywność enzymów

Każdy enzym posiada charakterystyczne dla siebie stężenie jonów wodorowych, w którym szybkość jego działania jest największa. Najczęściej wykres zależności aktywności enzymu od pH ma kształt dzwonu, z aktywnością sukcesywnie malejącą w miarę zwiększania lub zmniejszania pH w stosunku do optymalnego (Rys. 2).



Rys. 2. Zależność aktywności enzymu od pH (Koolman i Roehm, Color Atlas of Biochemistry).

Sytuacja ta wynika przede wszystkim z faktu, że w procesie biokatalizy biorą udział zjonizowane grupy funkcyjne aminokwasów budujących centrum aktywne enzymu. Zmieniające się stężenia jonów wodorowych i wodorotlenowych powodują inaktywację enzymu poprzez rozrywanie wiązań jonowych i wodorowych pomiędzy grupami funkcyjnymi łańcuchów bocznych, które stabilizują strukturę przestrzenną enzymu lub zaburzanie ładunku grup zaangażowanych w katalizę. Optymalne pH enzymu jest jego cechą charakterystyczną i tak np. dla pepsyny jest to 2, dla glukozy-6-fosfatazy – 8, a dla arginazy powyżej 10.

Dlatego też niezwykle istotne jest w trakcie badań laboratoryjnych stosowanie odpowiednich buforów. Powinny one mieć zarówno odpowiednie pH jak i skład ponieważ niektóre składniki np. fosforany, estry fosforanowe czy kwasy karboksylowe mogą wiązać się z enzymem i zmieniać jego aktywność.

ODCZYNNIKI

1. 0,2 M sacharoza w 0,04 M buforze octanowym pH 4,7
2. 0,4 M sacharoza w wodzie
3. 1% kwas dinitrosalicylowy (DNS) w 0,4 M NaOH
4. 9 mM CuSO₄ w buforze octanowym
5. Uniwersalny bufor Brittona i Robinsona
 - a. Roztwór A – 0,04 M kwas octowy, 0,04 M kwas fosforowy, 0,04 M kwas borowy
 - b. Roztwór B – 0,2 M wodorotlenek sodu
 - 100ml A + 18,5 ml B = pH 3;
 - 100ml A + 36 ml B = pH 5;
 - 100ml A + 53 ml B = pH 7;
 - 100ml A + 70 ml B = pH 9,wszystkie uzupełniać wodą do 400 ml
6. Wzorce glukozy: 40 µg/ml, 80 µg/ml, 160 µg/ml, 320 µg/ml, 400 µg/ml

WYKONANIE

Grupa dzieli się na dwa zespoły. Każdy zespół przeprowadza całe ćwiczenie we własnym zakresie (każdy zespół pracuje na swoim ekstrakcie) wykonując wszystkie przewidziane reakcje.

1. Przygotowanie ekstraktu zawierającego inwertaze

5 g drożdży utrzeć na sucho w moździerzu z ok. 3 g piasku. Po dokładnym roztarciu stopniowo dolewać do moździerza 15 ml wody. Całość przenieść łyżeczką do falkona, przygotować probówkę równoważną i zwirować przez 15 minut w 4°C, przy 9 tys. obrotów. 8,3 ml uzyskanego supernatantu przepipetować do falkona i dopełnić do 50 ml zmrożonym acetonem. Strącać białka przez pół godziny w lodówce a następnie zwirować w tych samych warunkach co poprzednio. Uzyskany osad rozpuścić w 20 ml wody i umieścić na lodzie.

2. Wykrywanie aktywności inwertazy względem sacharozy

Przygotować dwie probówki. Przeprowadzić reakcję według Tabeli 1.:

Tab. 1. Wykrywanie aktywności inwertazy względem sacharozy.

	<i>Kontrola (1)</i>	<i>Badana (2)</i>
<i>sacharoza w buforze octanowym</i>	500 μ l	500 μ l
<i>enzym</i>	-	500 μ l
<i>inkubować na stole przez 5 minut, po czym zamrozić na 5 minut</i>		
<i>DNS</i>	100 μ l	100 μ l
<i>enzym</i>	500 μ l	-
<i>gotować przez 5 minut, po czym schłodzić w zamrażarce</i>		

Po schłodzeniu zmierzyć absorbancję próbek przy długości fali 540 nm względem próby kontrolnej.

3. Wykrywanie aktywności inwertazy względem laktozy, maltozy i trehalozy

Przygotować 6 probówek. Przeprowadzić reakcję tak jak w poprzednim punkcie, zamiast sacharozy użyć innych dwucukrów. Każda próba badana powinna mieć odpowiednią próbę kontrolną (Tab. 2.).

Tab. 2. Wykrywanie aktywności inwertazy względem innych cukrowców.

	<i>Kontrola_(L) (1)</i>	<i>Badana_(L) (2)</i>	<i>Kontrola_(M) (3)</i>	<i>Badana_(M) (4)</i>	<i>Kontrola_(T) (5)</i>	<i>Badana_(T) (6)</i>
<i>dwucukier w buforze octanowym</i>	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l
<i>enzym</i>	-	500 μ l	-	500 μ l	-	500 μ l
<i>inkubować na stole przez 5 minut, po czym zamrozić na 5 minut</i>						
<i>DNS</i>	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
<i>enzym</i>	500 μ l	-	500 μ l	-	500 μ l	-
<i>gotować przez 5 minut, po czym schłodzić w zamrażarce</i>						

Po schłodzeniu zmierzyć absorbancję próbek przy długości fali 540 nm względem odpowiedniej próby kontrolnej (1 – 2, 3 – 4, 5 – 6).

4. Badanie wpływu inhibitora

Przygotować 4 probówki. Przeprowadzić reakcję według Tabeli 3.:

Tab. 3. Badanie wpływu inhibitora.

	<i>Kontrola (1)</i>	<i>Badana (2)</i>	<i>Kontrola I (3)</i>	<i>Badana I (4)</i>
<i>sacharoza w buforze octanowym</i>	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
<i>CuSO₄</i>	-	-	100 µl	100 µl
<i>bufor octanowy</i>	100 µl	100 µl	-	-
<i>enzym</i>	-	500 µl	-	500 µl
<i>inkubować na stole przez 5 minut, po czym zamrozić na 5 minut</i>				
<i>DNS</i>	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
<i>enzym</i>	500 µl	-	500 µl	-
<i>gotować przez 5 minut, po czym schłodzić w zamrażarce</i>				

Po schłodzeniu zmierzyć absorbancję próbek przy długości fali 540 nm względem odpowiedniej próby kontrolnej (1 – 2, 3 – 4).

5. Badanie wpływu pH na aktywność inwertazy

Przygotować 5 probówek. Do badania aktywności inwertazy w różnych pH wykorzystać szereg buforów Brittona i Robinsona. Przeprowadzić reakcję zgodnie z Tabelą 4.:

Tab. 4. Badanie wpływu pH.

	<i>Kontrola (pH 7) (1)</i>	<i>pH 3 (2)</i>	<i>pH 5 (3)</i>	<i>pH 7 (4)</i>	<i>pH 9 (5)</i>
<i>bufor o odpowiednim pH</i>	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
<i>sacharoza w wodzie</i>	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
<i>enzym</i>	-	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
<i>inkubować na stole przez 5 minut, po czym zamrozić na 5 minut</i>					
<i>DNS</i>	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
<i>enzym</i>	500 µl	-	-	-	-
<i>gotować przez 5 minut, po czym schłodzić w zamrażarce</i>					

Po schłodzeniu zmierzyć absorbancję próbek przy długości fali 540 nm względem próby kontrolnej.

6. Badanie wpływu temperatury na aktywność inwertazy

Przygotować 6 próbek. Przeprowadzić reakcję zgodnie z Tabelą 5. Kontrolę przygotować tak jak w zadaniu 2. Do pozostałych pięciu próbek odmierzyć po 500 μl sacharozy w buforze octanowym. Następnie każdą z próbek inkubować przez 10 minut w następujących lokalizacjach:

- 1) 4°C w lodówce
- 2) 25°C na stole
- 3) 50°C w cieplarni
- 4) 70°C w bloku grzewczym
- 5) 100°C w zlewce w łaźni wodnej

Po upływie czasu, nie wyjmując próbek z miejsc gdzie się znajdują dodać do nich po 500 μl ekstraktu enzymatycznego i inkubować przez 5 minut. Po inkubacji bardzo szybko wstawić wszystkie próbki na 5 minut do zamrażarki, a następnie dodać 100 μl DNS i gotować przez 5 minut. Wstawić do zamrażarki i po wystygnięciu zmierzyć absorbancję próbek przy długości fali 540 nm względem próby kontrolnej.

Tab. 5. Badanie wpływu temperatury.

	<i>kontrola (25°C) (1)</i>	<i>4°C (2)</i>	<i>25°C (3)</i>	<i>50°C (4)</i>	<i>70°C (5)</i>	<i>100°C (6)</i>
<i>sacharoza w buforze octanowym</i>	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl
<i>inkubować przez 10 minut w odpowiedniej temperaturze</i>						
<i>enzym</i>	-	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl
<i>inkubować w danej temperaturze przez 5 minut, po czym zamrozić na 5 minut</i>						
<i>DNS</i>	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
<i>enzym</i>	500 μl	-	-	-	-	-
<i>gotować przez 5 minut, po czym schłodzić w zamrażarce</i>						

7. Przygotowanie krzywej wzorcowej

Do próbek odmierzyć po 1 ml wzorcowych rozcieńczeń glukozy, do każdej dodać po 100 μl DNS i gotować przez 5 minut. Wstawić do zamrażarki i po wystygnięciu zmierzyć absorbancję próbek przy długości fali 540 nm względem wody. Sporządzić wykres zależności absorbancji od stężenia glukozy. Na podstawie krzywej, dla wszystkich przeprowadzonych zadań obliczyć aktywność enzymu – μmol heksoz uwolnionych w wyniku reakcji hydrolizy substratu w ciągu 1 minuty działania enzymu.