



Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny



ENZYMOLOGIA

Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

**Centrum Bioimmobilizacji
i Innowacyjnych Materiałów
Opakowaniowych**



ul. Klemensa Janickiego 35
71-270 Szczecin



Ćwiczenie 2

Hydrolazy.

**Czynniki wpływające na szybkość
reakcji enzymatycznych**

Ćwiczenie 2

Hydrolazy. Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznych

Wśród czynników wpływających na szybkość reakcji enzymatycznych wymienić należy:

- stężenie substratu (stała Michaelisa – temat, który zostanie zrealizowane w drugim bloku ćwiczeń),
- stężenie enzymu (więcej informacji → Ćwiczenie 4),
- temperaturę,
- pH środowiska,
- obecność aktywatorów,
- obecność inhibitorów.

Stężenie enzymu. Zależność szybkości reakcji od stężenia enzymu najdogodniej jest obserwować przy dużych stężeniach substratu, kiedy szybkość ta nie zależy już od stężenia substratu (reakcja zerowego rzędu) i jest proporcjonalna do stężenia enzymu (przy niezbyt dużych stężeniach enzymu).

Wpływ temperatury i energia aktywacji. Ze wzrostem temperatury zwiększa się szybkość reakcji enzymatycznej (jak każdej reakcji chemicznej). Po osiągnięciu pewnego optimum w danych warunkach szybkość reakcji zaczyna maleć w następstwie denaturacji cieplnej enzymu. Szybkość inaktywacji enzymów w roztworze wzrasta gwałtownie w miarę podwyższania temperatury. Większość enzymów traci nieodwracalnie aktywność po przekroczeniu temp. 65°C i tylko nieliczne wytrzymują krótkie gotowanie (rybonukleaza czy pepsyna w pH 1). Szybkość inaktywacji cieplnej enzymów przeważnie zależy od pH roztworów. Wyższą temperaturę bez utraty aktywności wytrzymują enzymy suche i dlatego przechowywanie enzymów zliofilizowanych może zapobiegać zbyt szybkiej ich inaktywacji. Jeśli działanie enzymów (w roztworze) jest ograniczone do kilku sekund, temperatura może być wysoka, ale do działania enzymu przez kilka dni musi być ona znacznie niższa (enzym musi być długo czynny). Optymalne temperatury są więc zależne od czasu inkubacji i od pH, a ponadto od stężenia soli, obecności aktywatorów czy inhibitorów (np. w postaci śladowych zanieczyszczeń odczynników jonami metali). W zakresie temperatur, w których denaturacja enzymu jest praktycznie nieistotna, a więc do ok. 37°C, podniesienie temperatury o 10°C zwiększa szybkość reakcji mniej więcej 2-krotnie.

Na podstawie teorii kinetyczno-cząsteczkowej wiadomo, że reakcja chemiczna może zajść wówczas, gdy cząsteczki są efektywne i prowadzą do powstania produktu reakcji. Do reakcji dochodzi wtedy, gdy cząsteczka ma energię kinetyczną większą od pewnej określonej wartości (cząsteczki aktywne). Dopiero po osiągnięciu energii aktywacji (różnej dla różnych

reakcji) cząsteczki stają się zdolne do reagowania. **Energia aktywacji** jest więc graniczną, najmniejszą ilością energii, jaką musi mieć cząsteczka, aby zderzenie było skuteczne (np. do rozluźniania wiązań w reagujących cząsteczkach, pokonania sił odpychania w pierwszym etapie reakcji).

W zwykłych warunkach liczba cząsteczek zaktywowanych jest niezmiernie mała i reakcje przebiegają niezwykle wolno, ponieważ musi być przekroczony pewien próg energetyczny. Aby go przekroczyć, trzeba albo dostarczyć energię aktywacji albo ją obniżyć. Można dostarczyć układowi energii w postaci ciepła, światła (promieniowania) lub energii elektrycznej. Wraz ze wzrostem temperatury wzrasta szybkość reakcji chemicznej, ponieważ podwyższenie temperatury zwiększa energię kinetyczną cząsteczek, a tym samym liczbę cząsteczek zaktywowanych.

O wiele szybciej przebiegają reakcje w obecności katalizatorów. Reagujące cząsteczki mogą wchodzić z katalizatorem w nietrwałe połączenia, przy czym bariera energetyczna tej ubocznej reakcji jest dużo niższa niż reakcji głównej. Następuje tutaj jak gdyby obejście wysokiej bariery energetycznej reakcji głównej przez drogę o barierze niższej. Można to ująć w następującym równaniu:



gdzie: A i B – substraty reakcji, AB – produkt reakcji, K – katalizator.

Nawet niewielkie obniżenie energii aktywacji prowadzi do znacznego wzrostu szybkości reakcji; zrozumiałe więc staje się ogromne przyspieszenie szybkości reakcji w obecności katalizatorów. Na przy energia aktywacji procesu rozkładu H_2O_2 na tlen i wodę wynosi ok. 75 kJ/mol. Dodanie nieorganicznego katalizatora (czerń platynowa) obniża tę energię do 49 kJ/mol, a w organizmie w obecności katalazy energia wynosi tylko 23 kJ/mol. W wyniku takiego obniżenia energii aktywacji szybkość reakcji wzrasta w obecności czerni platynowej 20 000 razy, a w obecności katalazy - aż $3 \cdot 10^{11}$ razy.

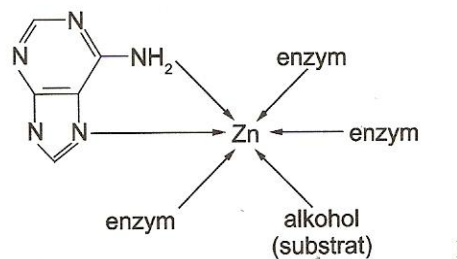
Wpływ pH. Szybkość reakcji katalizowanej przez enzym jest maksymalna przy określonej wartości pH, a maleje w miarę oddalania się od niej (zbyt kwasowe lub zasadowe środowisko może powodować denaturację białka). Zmiany aktywności enzymatycznej przy różnym pH są wywoływane zmianami w stopniu zjonizowania składników układu: enzymu, substratu i kompleksu enzym-substrat. Optymalne pH do działania niektórych enzymów zależy z tego powodu i od rodzaju substratu. Grupy czynne centrum aktywnego enzymu tylko w jednej z jonowych form wykazują właściwości katalityczne; podobnie w większości wypadków tylko jedna z możliwych form grup jonizujących substratu jest rzeczywiście aktywna w reakcji

enzymatycznej. W tworzeniu kompleksu enzym-substrat duże znaczenie ma ładunek substratu i enzymu, ponieważ siły wiążące te dwa związki mogą mieć charakter elektrostatyczny.

Wpływ aktywatorów. Różnego rodzaju aktywatory nie biorące udziału w reakcji katalitycznej uczynniają enzymy lub zwiększają ich aktywność. Można je ująć 3 grupy:

- 1) jony niektórych metali, wbudowanych w cząsteczkę apoenzymu,
- 2) związki wielkocząsteczkowe o charakterze białkowym działające przez odmaskowanie grup czynnych enzymu
- 3) małowcząsteczkowe związki organiczne usuwające wpływ substancji hamujących.

Liczne pierwiastki śladowe są niezbędnymi składnikami pokarmowymi dla organizmu, ponieważ pełnią rolę swoistych aktywatorów poszczególnych enzymów. Są one najczęściej czynnikami układu aktywującego, tzn. białko enzymatyczne jest niezdolne do aktywacji substratu, jeżeli brakuje odpowiedniego jonu metalu. Usunięcie go przez dializę powoduje odwracalną utratę aktywności, a ponowne dodanie wraca aktywność. Dla niektórych enzymów metale są niezbędne do wytworzenia wiązania między enzymem a substratem lub między enzymem, koenzymem i substratem (rys. 1).



Rys. 1. Udział metalu w wiązaniu enzymu z substratem (Kłyszajko-Stefanowicz, 2003)

W innych enzymach metal stanowi istotną część składową centrum katalitycznego enzymu, który bez metalu jest nieczynny) np. w enzymach przenoszących elektrony (np. oksydazy mono- i polifenoli, oksydaza cytochromowa. Enzymy są aktywowane najczęściej przez następujące jony: Mg^{2+} (fosfatazy, fosforylasy, fosfokinazy, syntetazy), Zn^{2+} (anhydraza węglanowa, dehydrogenaza mleczanowa i alkoholowa oraz proteazy), Mn^{2+} (peptydazy, arginaza), Ca^{2+} (lipaza), Cu^{2+} (oksydazy) oraz niekiedy Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Na^+ , K^+ . Kationy metali ciężkich mają na ogół działanie hamujące. Aniony mają mały wpływ na aktywność enzymów. Wyjątkiem jest amylaza aktywowana przez chlorki.

Enzymy niekiedy są wydzielane w postaci nie wykazującej czynności katalitycznej, czyli w postaci prekursorów (proenzymów). Na przykład tripsynogen przeobraża się w czynną postać - tripsynę pod wpływem aktywatora - proteolitycznego enzymu enteropeptydazy (enterokinazy).

Aktywność wielu enzymów łatwo ulega zahamowaniu pod wpływem łagodnych środków

utleniających, np. tlenu atmosferycznego, co jest katalizowane przez metale ciężkie znajdujące się w śladowych ilościach bądź w samym materiale czy odczynnikach, bądź też pochodzące z metalowych przyrządów stosowanych w preparatyce enzymów. Zahamowanie takie jest często procesem odwracalnym i aktywność powraca wskutek dodania ciał redukujących lub wiążących kompleksowo metale ciężkie. Na przykład utlenienie grup -SH enzymu bardzo często prowadzi do utraty aktywności; odtwarza ją dodatek cysteiny, zredukowanego glutationu czy merkaptoetanolu wskutek redukcji ugrupowania -S-S- do -SH. Przykładem aktywacji przez usunięcie wpływu inhibitora jest również reaktywacja oksydazy cytochromowej zatrutej tlenkiem węgla. Powstały kompleks enzym-tlenek węgla rozpada się z łatwością na świetle słonecznym, co przywraca aktywność enzymu.

Należy podkreślić, że aktywacja enzymu przez aktywator jest procesem zupełnie różnym od aktywacji substratu przez czynny enzym, która polega na jego połączeniu z centrum katalitycznym tego enzymu.

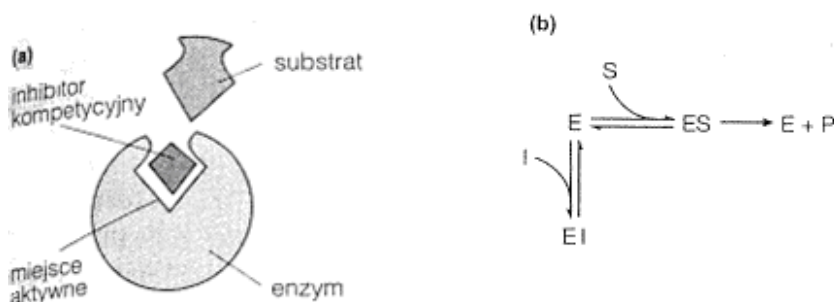
Wpływ inhibitorów. Istnieje wiele typów cząsteczek, które są zdolne do zakłócania aktywności danego enzymu. Każda cząsteczka działająca bezpośrednio na enzym w kierunku zmniejszania jego szybkości katalitycznej jest określana jako **inhibitor**. Pewne inhibitory enzymów są normalnymi metabolitami komórkowymi, które hamują dany enzym w ramach naturalnej metabolicznej kontroli odpowiedniego szlaku. Inne inhibitory mogą być substancjami obcymi dla organizmu, takimi jak toksyny i leki, i w tym przypadku hamowanie enzymu może mieć działanie terapeutyczne, ale również letalne. Rozróżnia się dwa główne typy inhibicji enzymów: **nieodwracalną** i **odwracalną**, przy czym inhibicja odwracalna dzieli się na inhibicję **kompetycyjną** i **niekompetycyjną**. Inhibicję odwracalną można przezwyciężyć usuwając inhibitor z enzymu, na przykład w drodze dializy, ale jest to z definicji niemożliwe w przypadku inhibicji nieodwracalnej.

- **Inhibicja nieodwracalna.** Aktywność enzymatyczną nieodwracalnie hamują związki chemiczne powodujące denaturację cząsteczki białkowej (również czynniki fizyczne), utlenianie grup -SH lub ich alkilowanie (jodoctan, specyficzny inhibitor dehydrogenazy alkoholowej), tworzenie merkaptidów itp. W inhibicji nieodwracalnej inhibitor łączy się kowalencyjnie z enzymem lub wiąże się z nim tak silnie, że jego dysocjacja jest bardzo powolna. Przykład - bardzo silna trucizna, paraliżująca układ nerwowy, diizopropyl fluorofosforan (D - diizopropyl fluorophosphate), który nieodwracalnie wiąże się z seryną w miejscu aktywnym acetylocholinoesterazy (i innych enzymów hydrolitycznych), tworząc nieaktywną katalitycznie pochodną. Także czynniki alkilujące, jak np. amid kwasu jodoctowego, nieodwracalnie hamują aktywność katalityczną enzymów, modyfikując głównie reszty cysteiny.

- **Odwracalna inhibicja kompetycyjna.** Inhibitor kompetycyjny jest zazwyczaj strukturalnie podobny do normalnego substratu danego enzymu. Dzięki temu współzawodniczy z cząsteczkami substratu o wiązanie się z miejscem aktywnym (Rys.2a) Enzym może wiązać albo cząsteczkę substratu, albo cząsteczkę inhibitora ale nie obie równocześnie (Rys. 2b). Inhibitor kompetycyjny wiąże się z **miejscem aktywnym odwracalnie**. Przy **dużych stężeniach substratu** działanie inhibitora kompetycyjnego zostaje przewyżczone, ponieważ duże stężenie substratu będzie z powodzeniem współzawodniczyć z cząsteczką inhibitora o wiązanie się w miejscu aktywnym. Dobrego przykładu hamowania kompetycyjnego dostarcza **dehydrogenaza bursztynianowa**. Enzym ten używa **bursztynianu** jako substratu i jest hamowany kompetycyjnie przez **malonian**, który różni się od bursztynianu posiadaniem tylko jednej, a nie dwóch grup metylenowych:

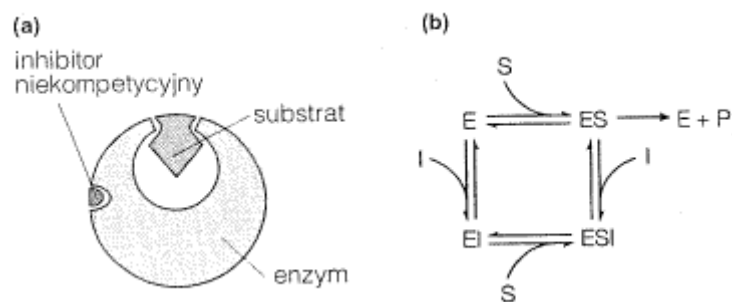


Wiele leków działa przez naśladowanie struktury substratu specyficznego dla enzymu docelowego i stąd działają one jako inhibitory kompetycyjne tego enzymu.



Rys. 2. Charakterystyka hamowania kompetycyjnego: a) inhibitor kompetycyjny współzawodniczy substratem o wiązanie w miejscu aktywnym; b) enzym może wiązać albo substrat, albo inhibitor kompetycyjny, ale nie obydwa naraz (Hames i Hooper, 2002)

- **Odwracalna inhibicja niekompetycyjna.** Inhibitor niekompetycyjny wiąże się **odwracalnie w innym miejscu enzymu niż jego miejsce aktywne** (Rys. 3a) i powoduje zmianę przestrzennego kształtu enzymu, co prowadzi do zmniejszenia aktywności katalitycznej. Ponieważ inhibitor wiąże się w innym miejscu niż substrat, enzym może wiązać albo inhibitor, albo substrat, lub też inhibitor i substrat równocześnie (Rys. 3b).



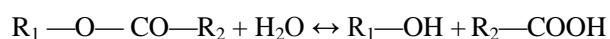
Rys. 3. Charakterystyka hamowania niekompetycyjnego. a) inhibitor niekompetycyjny wiąże się w miejscu odmiennym od miejsca aktywnego; (b) enzym może wiązać albo substrat, albo inhibitor niekompetycyjny, albo obydwa naraz (Hames i Hooper, 2002)

Hydrolazy. Do **hydrolaz (klasa 3)** zalicza się enzymy katalizujące proces rozpadu substratu z udziałem cząsteczek H_2O . 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, tripsyna, papaina.

W klasie hydrolaz można wyróżnić następujące ważniejsze podklasy enzymów działających na wiązania:

- estrowe (3.1),
- glikozydowe (3.2),
- peptydowe (3.4),
- wiązania C-N inne niż peptydowe (3.5) - glutaminaza, arginaza, ureaza,
- na wiązania bezwodników kwasowych (3.6),
- wiązania -N (3.9) - fosfoamidaza rozkładająca fosfokreatynę .

1. Hydrolazy estrów. **Lipaza** jest enzymem katalizującym 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. Katalizują więc one rozszczepianie specjalnego wiązania, a mniejszą rolę odgrywa budowa składników estru.

Lipaza trzustkowa jest najważniejszym enzymem lipolitycznym przewodu pokarmowego. Odszczepia ona kwasy tłuszczowe znajdujące się w pozycjach α i α' (na β -acyloglicerole

działa lipaza jelitowa). Lipaza trzustkowa jest bardzo nietrwała i łatwo traci swe właściwości pod działaniem kwasów. Aktywność lipazy wzmagają kwasy żółciowe, które obniżając napięcie powierzchniowe ułatwiają zemulgowanie tłuszczu. Optymalne pH dla lipazy trzustkowej wynosi 7-8,5. Jak wszystkie lipazy jest ona odporna na niską temperaturę i rozwija swą czynność jeszcze w temp. 25°C (więcej informacji na temat lipazy → ćwiczenie 3).

2. Hydrolazy glikozydowe. Rozszczepiają wiązania glikozydowe glikozydów, kilku- i wielocukrów. Są to enzymy o dużej swoistości działania. 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), atakujące w sposób chaotyczny wiązania α -1,4-glikozydowe z wyjątkiem wiązania maltozy. Produktem hydrolizy jest mieszanina dekstryn, maltozy i glukozy. Reakcja z jodem szybko znika, natomiast redukcja wzrasta powoli (rys. 4). α -Amylazy nie mają zdolności hydrolizowania wiązań α -1,6; reakcja ustaje więc w chwili, gdy enzym zbliży się do rozgałęzienia cząsteczki cukrowca i pozostają fragmenty zwane dekstrynami granicznymi.



Rys. 11.27. Działanie α -amylazy na amylozę

Rys. 4. Działanie α -amylazy na amylozę (Kłyszajko-Stefanowicz, 2003)

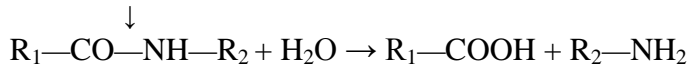
Amylaza ślinowa wykazuje aktywność w roztworach lekko zasadowych, obojętnych i kwasowych. Optymalne pH działania: 6,6. Bardzo duży wpływ na działanie amylazy śliny wywierają elektrolity (Cl^- , Br^- , NO_3^-). Usunięcie chlorków ze śliny inaktywuje amylazę.

Amylaza trzustkowa wykazuje podobną czynność jak amylaza ślinowa, ale wiele silniejszą. Enzym ten działa jeszcze w rozcieńczeniu 1: 100 000 000, a w ciągu 30 min. 1 mg amylazy trawi 20 g skrobi. Do jej aktywności niezbędne są niektóre jony nieorganiczne, szczególnie chlorki (podobnie jak w przypadku amylazy ślinowej). Optymalne pH działania: 6,5-8,0. Amylaza trzustkowa, w odróżnieniu od ślinowej, trawi skrobię niegotowaną.

W soku trzustkowym oprócz amylazy występują jeszcze inne enzymy rozkładające cukry,

takie jak maltaza, laktaza i sacharaza (w małych ilościach).

3. Hydrolazy peptydowe. Są to enzymy rozszczepiające hydrolytycznie wiązania peptydowe według schematu:



Znaczna ich część to enzymy trawienne, występujące w przewodzie pokarmowym, inne działają poza nimi.

Enzymy proteolityczne dzieli się tradycyjnie na dwie grupy: endo- i egzopeptydazy. **Endopeptydazy** działają na cząsteczki białek i polipeptydów, rozbijając wiązania peptydowe utworzone wyłącznie przez określone aminokwasy niezależnie od położenia wiązania w łańcuchu peptydowym.

Egzopeptydazy mogą odszczepiać jedynie aminokwasy skrajne *N*- i *C*-końcowe z tych łańcuchów i są nazywane odpowiednio amino- i karboksypeptydazami. Ze względu na rodzaj centrum aktywnego, enzymy proteolityczne często dzieli się na 4 grupy:

1) proteazy serynowe, inaktywowane przez DIFP (**diisopropyl fluorophosphate**), np. trypsyna, chymotrypsyna, elastaza, subtilopeptydazy, proteinaza chromatynowa;

2) proteazy sulfhydrylowe, inaktywowane przez *p*-chlorortęciobenzoesan (**p-chloromercuric benzoate - PCMB**), np. papaina i inne proteazy roślinne;

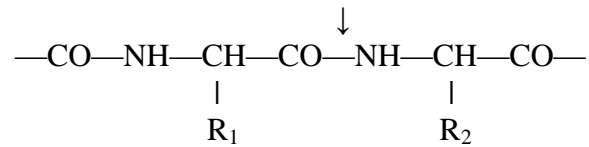
3) metaloproteazy, zwykle zawierające cynk w centrum aktywnym, np. karboksypeptydazy, obojętne proteazy mikroorganizmów;

4) proteazy kwasowe, wykazujące maksymalną aktywność przy niskich wartościach pH i zawierające grupy karboksylowe w centrum aktywnym, np. pepsyna, renina i wiele proteaz grzybowych.

Zgodnie z racjonalną klasyfikacją i nomenklaturą endopeptydazy zaliczane są do hydrolaz peptydylopeptydowych. Enzymom tym przypada zapoczątkowanie procesu trawienia białek w przewodzie pokarmowym.

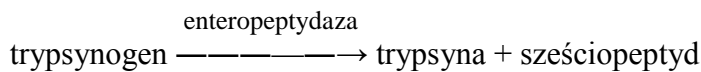
Pepsyna. Jest to najważniejszy enzym trawienny soku żołądkowego działający w silnie kwasowym środowisku. Wykazuje ona specyficzność względem aminokwasów tworzących rozkładane przez nią wiązania peptydowe. Głównymi miejscami ataku są wiązania

peptydowe, w których bierze udział grupa aminowa aminokwasów aromatycznych (więcej informacji o pepsynie → drugi blok ćwiczeń):



gdzie: R₂ - reszta fenyloalaniny, tyrozyny, tryptofanu, leucyny, kwasu asparaginowego i kwasu glutaminowego (wg Lehningera 1975).

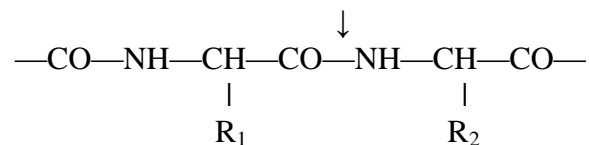
Trypsyna jest enzymem wydzielanym przez trzustkę w postaci nieczynnej, tj. trypsynogenu, który dopiero w jelicie zostaje uczynniony przez specjalny enzym zwany enteropeptydazą (enterokinazą), na skutek odszczepienia od trypsynogenu sześćiopeptydu.



Powstała trypsyna aktywuje z kolei dalszą porcję trypsynogenu (aktywacja katalityczna).

Pod wpływem trypsyny białka ulegają rozkładowi do mieszaniny dużych peptydów, lecz w odróżnieniu od trawienia pepsyną reakcja ta wymaga środowiska o pH 8-9. Trypsyna może jednak rozkładać na małe peptydy - nie tylko białka (łatwiej rozkłada zdenaturowane niż rodzime), ale i „peptony”, powstałe w żołądku pod działaniem pepsyny. Przygotowawcze trawienie białka przez sok żołądkowy jest bardzo korzystne dla działalności tryptycznej. Niekiedy w wyniku działania trypsyny uwalniają się pojedyncze aminokwasy, jak tyrozyna czy tryptofan.

Trypsyna jest hydrolazą peptydylopeptydową o dużej specyficzności, hydrolizująca tylko wiązania peptydowe utworzone przez grupę karboksylową lizyny lub argininy:



gdzie: R₁ – reszta lizyny lub argininy, R₂ – reszta dowolnego aminokwasu.

Wszystkie peptydy powstające pod działaniem trypsyny mają lizynę lub argininę jako końcowe aminokwasy z wolną grupą karboksylową.

Trypsyna przyspiesza ponadto krzepnięcie krwi, ale nie ścina mleka (chymotrypsyna odwrotnie).

Schemat doświadczenia przedstawiono w tabeli:

Nr próbówki	I	II	I'	II'
temperatura [°C]	23	23	37	37
mleko (ml)	2	2	2	2
czerwień metylowa (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25
0,05 M bufor fosforanowy pH 7,4 (ml)	-	1	-	1
roztwór lipazy (ml)	1	-	1	-

Wyjaśnienie:

Lipaza należy do enzymów hydrolitycznych - pod jej działaniem rozpadowi hydrolitycznemu ulega wiązanie estrowe w trójglicerydach. W wyniku uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych następuje wzrost zakwaszenia środowiska.

TRYPSYNA

** 5 ml roztworu trypsyny przenieść do szklanej próbówki i wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 10 minut - denaturacja enzymu! (przygotowany w ten sposób roztwór zdenaturowanej trypsyny zostanie wykorzystana w doświadczeniu 2 i 3)*

2) WYKAZANIE PROTEOLITYCZNEJ AKTYWNOŚCI TRYPSYNY (rozkład białka jaja kurzego) (EC 3.4–peptydazy)

Do 4 szklanych probówek chemicznych wprowadzić po 1 ml białka jaja kurzego.

Następnie:

- a. do pierwszej próbówki dodać 2 ml 0,2% roztworu Na_2CO_3 i 2 ml roztworu trypsyny, wymieszać zawartość próbówki.
- b. do drugiej próbówki dodać 2 ml 0,2% roztworu Na_2CO_3 i 2 ml roztworu zdenaturowanej trypsyny*, wymieszać zawartość próbówki.
- c. do trzeciej próbówki dodać 2 ml 0,2N roztworu HCl i 2 ml roztworu trypsyny, wymieszać zawartość próbówki.
- d. do czwartej próbówki dodać 2 ml 0,2% roztworu Na_2CO_3 i 2 ml wody destylowanej i wymieszać zawartość próbówki.

Wszystkie próbówki wstawić do łaźni wodnej o stałej temperaturze 37°C na około 40-45 min.

Po tym czasie obserwować zmiany w próbówkach.

Wyjaśnienie

W prawidłowych warunkach (pH 7,5-8,0 i optymalna temp. 37°C) trypsyna rozkłada białko, co widać w pierwszej próbówce. W drugiej próbówce zdenaturowana pod wpływem wysokiej

temperatury trypsyna jest nieaktywna, a więc nie rozkłada białka. W nieprawidłowym, kwaśnym pH, trypsyna nie działa (trzecia próbówka). W czwartej próbówce reakcja nie nastąpił rozkład białka, bo nie dodaliśmy enzymu.

3) TRAWIENIE KAZEINY TRYPSYNĄ W ROZTWORZE ALKALICZNYM

Przygotować 2 szklane próbówki chemiczne.

a. do pierwszej próbówki odpipetować 2 ml roztworu trypsyny i 2 ml alkalicznego roztworu kazeiny.

b. do drugiej próbówki odpipetować 2 ml roztworu zdenaturowanej trypsyny* i 2 ml alkalicznego roztworu kazeiny.

Obie próbówki wstawić do łaźni wodnej temp. 37°C na około 30 minut. Po tym czasie do obu próbówek dodać 3-5 ml 3% roztworu kwasu octowego i obserwować zmiany zachodzące w próbówkach.

Wyjaśnienie

W pierwszej próbówce następuje rozkład kazeiny, ponieważ enzym jest aktywny (alkaliczne środowisko i optymalna temperatura 37°C) i nie pojawia się osad kazeiny po dodaniu kwasu octowego. W drugiej próbówce enzym został zniszczony przez zagotowanie i po dodaniu kwasu octowego powstaje osad niestrawionej kazeiny. Dodanie kwasu octowego wytwarza pH punktu izoelektrycznego charakterystycznego dla kazeiny (pH 4,5), w którym białko to jest nierozpuszczalne.

AMYLAZA

4) WPLYW PH NA AKTYWNOŚĆ AMYLAZY (EC 3.2–glukozyłazy)

Do czterech próbówek odmierzyć po 4 ml 3% kleiku skrobiowego, 1ml jednego z czterech buforów fosforanowych o pH 5,8; 6,6; 7,4; 8,0. Zawartość próbówek wymieszać i wstawić do łaźni wodnej o temp. 37°C. Po ustaleniu się temperatury (co trwa 3 minuty) dodać do próbówek 0,5 ml roztworu amylazy i wymieszać. Po pięciominutowej inkubacji do każdej próbówki dodać po 1 ml roztworu jodu (płyn Lugola), wymieszać i po upływie 3-4 minut porównać uzyskane barwy. Wybrać optymalne pH dla działania amylazy.

Wyjaśnienie: Amylaza to enzym katalizujący hydrolityczny rozkład skrobi. Skrobia w reakcji z jodem tworzy kompleksy zabarwione niebiesko. Miarą intensywności hydrolitycznego rozkładu skrobi jest całkowity zanik lub zmniejszenie intensywności reakcji barwnej z jodem.

5) WPŁYW TEMPERATURY NA AKTYWNOŚĆ AMYLAZY

Do trzech probówek dodać kolejno po 2 ml 3% roztworu skrobi, 1ml buforu fosforanowego o pH 8,0. Jedną probówkę umieścić w łaźni lodowej, drugą w temperaturze pokojowej, a trzecią w łaźni o temperaturze 37°C. Do każdej probówki dodać po 0,5 ml roztworu amylazy i wymieszać. Po 5 minutach dodać do każdej probówki po 1 ml roztworu jodu i wymieszać. Porównać zabarwienie prób i na tej podstawie określić optimum temperatury dla amylazy ślinowej.

Wyjaśnienie: Większość enzymów organizmów zwierzęcych wykazuje optimum swego działania przy temperaturze 37°C. W przeprowadzonym doświadczeniu najwyższy stopień rozkładu skrobi obserwuje się w probówce inkubowanej w 37°C.

6) WPŁYW AKTYWATORÓW I INHIBITORÓW NA AKTYWNOŚĆ AMYLAZY

Do trzech probówek dodać po 2 ml 3% roztworu skrobi i 0,5 ml 0,05M buforu fosforanowego o pH 7,4. Do pierwszej dodać 0,5 ml wody destylowanej, do drugiej 0,5 ml 0,5% NaCl, do trzeciej 0,5 ml 0,5% roztworu CuSO₄. Do wszystkich trzech probówek dodać następnie po 0,5 ml roztworu amylazy lub rozcieńczonej śliny i wymieszać. Po 5 minutach inkubacji w temperaturze 37°C dodać po 1 ml roztworu jodu, wymieszać, obserwować zmiany zabarwienia.

Literatura:

- 1) Ćwiczenia z biochemii. Praca zbiorowa pod red. L. Kłyszajko-Stefanowicz. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.
- 2) Biochemia. Krótkie wykłady. Hames B.D. i Hooper N.M. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2002.
- 3) Przepisy do ćwiczeń z biochemii. Praca zbiorowa pod red. M. Stryjeckiej-Zimmer. Akademia Medyczna im. prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie, Lublin, 2004.