

# ENZYMOLOGIA



*Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa*

**Centrum Bioimmobilizacji  
i Innowacyjnych Materiałów  
Opakowaniowych**



ul. Klemensa Janickiego 35  
71-270 Szczecin



## Ćwiczenie 4

### $\alpha$ -Amylaza (cz. I)

**Oznaczenie aktywności enzymu  
metodą kolorymetryczną**

## Ćwiczenie 4.

### **$\alpha$ -Amylaza - oznaczanie aktywności enzymu metodą kolorymetryczną**

#### **Oznaczanie aktywności $\alpha$ -amylazy metodą Streeta-Closego w modyfikacji Richtera**

Wśród hydrolaz glikozydowych rozkładających skrobię i glikogen wyróżnia się trzy główne grupy:

- 1)  $\alpha$ -amylazy (endoamylazy) rozszczepiające wiązania wewnątrz cząsteczek substratu w sposób przypadkowy, występujące powszechnie u roślin, zwierząt i mikroorganizmów,
- 2)  $\beta$ -amylazy (egzoamylazy) hydrolizujące co drugie wiązanie od nieredukującego końca substratu, rozpowszechnione u roślin wyższych; brak ich u zwierząt,
- 3) glikoamylazy (egzoamylazy), hydrolizujące kolejno każde wiązanie od nieredukującego końca substratu, występujące u roślin, zwierząt i mikroorganizmów.

$\alpha$ -Amylaza (EC 3.2.1.-) jest jednym z głównych enzymów trawiennych. Hydrolizuje wiązania  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) w skrobi i glikogenie. Produktami jej działania są maltoza, maltotrioza, glukoza, a w przypadku hydrolizy amylopektyny, także krótkie, rozgałęzione  $\alpha$ -dekstryny (wiązanie  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) obecne w amylopektynie nie jest hydrolizowane przez  $\alpha$ -amylazę). Aktywatorami amylazy są jony chlorkowe; inhibitorami: jony jodkowe, cytrynian, szczawian i chelatory jonów dwuwartościowych (np. wersenian). Amylaza zawarta w ślinie ma niewielkie znaczenie dla całkowitego procesu trawienia cukrów złożonych, gdyż jej działanie jest krótkotrwałe — traci aktywność pod wpływem kwaśnego środowiska żołądka. U wielu zwierząt amylaza w ogóle nie występuje w ślinie. Znacznie istotniejsze jest działanie amylazy trzustkowej. Enzym ten ma niewielką masę cząsteczkową (45000 D) i może w niewielkim stopniu ulegać resorpcji z soku trzustkowego do krwi a następnie przechodzić łatwo do moczu. Niewielka aktywność  $\alpha$ -amylazy obecna w surowicy ludzi zdrowych (0.1-0.3 U/ml) może ulec znacznemu wzrostowi w przypadku niektórych schorzeń jak np. w ostrym zapaleniu trzustki lub przy zamknięciu przewodów trzustkowych przez nowotwór. Obniżona aktywność amylazy w surowicy może świadczyć o zapaleniu wątroby lub niewydolności trzustki. W tych stanach chorobowych, w których dochodzi do niedoboru enzymów trawiennych, pomaga się pacjentom stosując leki, zawierające skoncentrowane wyciągi z trzustki zwierzęcej, lub zestaw oczyszczonych z różnych źródeł enzymów hydrolitycznych. Jednym z takich leków jest Kreon. Jedna kapsułka tego leku zawiera (oprócz innych hydrolaz)  $\alpha$ -amylazę o aktywności 8000 U.

**Jednostki enzymatyczne.** Aktywność enzymatyczną można wyrazić na wiele sposobów. Najpowszechniejsze jest podawanie początkowej szybkości ( $V_0$ ) katalizowanej reakcji (np. w

$\mu\text{mol}$  substratu przekształconego w ciągu minuty;  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Istnieją też dwie standardowe jednostki aktywności enzymatycznej: bezwzględna **międzynarodowa jednostka standardowa (uniwersalna) (U)** oraz **katal (kat)**.

**Jednostka międzynarodowa** definiowana jest jako ilość enzymu, która katalizuje przekształcanie 1  $\mu\text{mol}$  substratu (lub 1  $\mu\text{mol}$  odpowiednich wiązań) w ciągu 1 minuty w 30°C, w warunkach optymalnych dla danego enzymu (zwłaszcza pH i stężenie substratu).

**Katal** jest przyjętą w układzie SI jednostką, zdefiniowaną jako aktywności enzymu, przy której jest on zdolny przekształcić 1 mol substratu w produkt w czasie 1 s w temp. 30°C i pozostałych w warunków optymalnych dla danego enzymu. Stąd  $1\text{Kat} = 6\cdot 10^7$  jednostek międzynarodowych, a 1 jednostka międzynarodowa = 16,67 nKat (nanokatali).

**Aktywność  $\alpha$ -amylazy można oznaczyć w różnych preparatach (w surowicy, w moczu, w preparacie leku) stosując zmodyfikowaną metodę Streeta-Closego.** Opiera się ona na następujących faktach. Jod ulega adsorpcji na cząsteczkach skrobi. Im większa jest masa skrobi w roztworze, tym więcej zaadsorbowanego jodu i tym intensywniejsze, niebieskie zabarwienie roztworu. Zmniejszenie nasilenia barwy skrobi z jodem w wyniku jej hydrolizy jest proporcjonalne do aktywności  $\alpha$ -amylazy.

**Stosując tę metodę należy prowadzić oznaczenie dla kilku różnych stężeń preparatu enzymu (preparatu, w którym oznaczamy aktywność enzymatyczną  $\alpha$ -amylazy), gdyż przy zbyt wysokim stężeniu enzymu jego aktywność może być na tyle wysoka, że doprowadzi do całkowitego rozłożenia skrobi i zaniku barwy, a to uniemożliwi prawidłowe obliczenie jego aktywności.**

Warunki doświadczenia (stężenie enzymu) muszą być tak dobrane, aby przez cały czas trwania reakcji, w mieszaninie reakcyjnej znajdował się nadmiar substratu. Tylko wtedy można przyjąć, że przez cały czas trwania reakcji enzym był wysycony substratem a więc szybkość reakcji była równa szybkości początkowej, która jest miarą aktywności enzymu. Oto schemat doświadczenia:

1. Przygotowanie 4 mieszanin reakcyjnych: każda z mieszanin będzie zawierała substrat: skrobię, bufor: 0.05 M bufor fosforanowy pH zawierający NaCl (jony chlorkowe jako aktywatory  $\alpha$ -amylazy) oraz enzym w jednym z czterech różnych rozcieńczeń.
2. Prowadzenie reakcji enzymatycznej przez 15 min. w 37°C. Reakcję zatrzymuje dodanie HCl.
3. Kolorymetryczny pomiar stężenia substratu pozostałego po hydrolizie w mieszaninie reakcyjnej. (Uwaga: im intensywniejsza barwa tym mniejsza aktywność enzymu).

## Część doświadczalna

### Ćwiczenie 4.

### **$\alpha$ -Amylaza – oznaczanie aktywności enzymu metodą kolorymetryczną**

Oznaczanie aktywności  $\alpha$ -amylazy metodą Streeta-Closego w modyfikacji Richtera

#### Oznaczenie aktywności amylazy trzustkowej w preparacie leku Kreon

##### ODCZYNNIKI:

- $\alpha$ -amylaza - preparat wyjściowy enzymu do oznaczenia aktywności  $\alpha$ -amylazy został przygotowany przez rozpuszczenie 1 kapsułki leku Kreon w 100 ml 0.05 M buforu fosforanowego o pH 7.4.
- 0.05 M bufor fosforanowy o pH 7.4,
- 0.05 M bufor fosforanowy o pH 7.4 zawierający NaCl,
- 1% kleik skrobiowy,
- roztwór jodu w jodku potasu,
- 0.5 M HCl.

##### WYKONANIE:

1. Przygotuj 6 rozcieńczeń  $\alpha$ -amylazy (preparatu leku Kreon):
  - I. 7 ml buforu fosforanowego + 0,5 ml amylazy (15-krotne rozcieńczenie)
  - II. 9,5 ml buforu fosforanowego + 0,5 ml amylazy (20-krotne rozcieńczenie)
  - III. 12 ml buforu fosforanowego + 0,5 ml amylazy (25-krotne rozcieńczenie)
  - IV. 14,5 ml buforu fosforanowego + 0,5 ml amylazy (30-krotne rozcieńczenie)
  - V. 17 ml buforu fosforanowego + 0,5 ml amylazy (35-krotne rozcieńczenie)
  - VI. 19,5 ml buforu fosforanowego + 0,5 ml amylazy (40-krotne rozcieńczenie)
2. Przygotuj 40 ml zbuforowanego roztworu substratu przez zmieszanie 20 ml roztworu skrobi i 20 ml buforu fosforanowego zawierającego NaCl.
3. Do nowych 7 probówek odmierz po 4 ml przygotowanego w punkcie 2 roztworu substratu.
4. Do probówki **nr 1** dodaj 1 ml 0,5M HCl (**próbka kontrolna, K**).
5. Probówki (7 sztuk) wstaw do łaźni wodnej (37°C) i inkubuj przez 3 minuty.

6. Po tym czasie wyjmij próbówki z łaźni i szybko dodaj do nich kolejno:

**Probówka nr 1 (K):** 1 ml buforu fosforanowego,

**Probówka nr 2 (B<sub>1</sub>):** 1 ml rozcieńczenia **I**,

**Probówka nr 3 (B<sub>2</sub>):** 1 ml rozcieńczenia **II**,

**Probówka nr 4 (B<sub>3</sub>):** 1 ml rozcieńczenia **III**,

**Probówka nr 5 (B<sub>4</sub>):** 1 ml rozcieńczenia **IV**,

**Probówka nr 6 (B<sub>5</sub>):** 1 ml rozcieńczenia **V**,

**Probówka nr 7 (B<sub>6</sub>):** 1 ml rozcieńczenia **VI**.

7. Zawartość próbek wymieszaj, wstaw ponownie do łaźni wodnej (37°C) i inkubuj przez 15 min.

8. Po zakończonej inkubacji do próbek **nr 2-7** dodaj po 1 ml 0.5M HCl, aby zatrzymać reakcję enzymatyczną.

9. Do wszystkich próbek odmierź po 1 ml roztworu I<sub>2</sub> w KI i wymieszaj zawartość próbek.

10. Barwa roztworów powinna być niebieska i powinna różnić się w niewielkim stopniu intensywnością. Jeśli przy najwyższych użytych stężeniach enzymu barwa roztworu jest czerwona lub żółta, należy te próbki odrzucić i nie brać ich pod uwagę przy obliczeniach aktywności enzymatycznej  $\alpha$ -amylazy.

11. Zmierz absorbancję próbek względem wody przy długości fali  $\lambda=620$  nm.

#### OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Efektem końcowym ćwiczenia jest oznaczenia aktywności enzymu w jednej kapsułce leku Kreon.

1. **Aktywność  $\alpha$ -amylazy zdefiniujemy jako ilość  $\mu$ moli zhydrolizowanych wiązań glikozydowych w czasie 1 min. w warunkach optymalnych (pH, temperatura, wysycenie substratem, obecność jonów chlorkowych).** W tym doświadczeniu oznaczamy ją mierząc kolorymetrycznie ubytek substratu. Należy więc określić jakiemu stężeniu substratu (a więc jakiemu stężeniu wiązań glikozydowych) odpowiada absorbancja ( $A_{620}$ ) próby kontrolnej. Stężenie wiązań glikozydowych obliczamy dzieląc masę (g) skrobi znajdującą się w 1 l roztworu przez masę cząsteczkową monomeru ( $C_6H_{10}O_5 = 162$  g).

W doświadczeniu stosowaliśmy dwukrotnie rozcieńczony **1% roztwór skrobi**; stąd jej końcowe stężenie wynosiło **5 g/1 l**.

Stężenie wiązań glikozydowych wynosiło więc: **5 g : 162 g/mol = 0.0031M (3.1 mM)**. Ponieważ w mieszaninie inkubacyjnej znajdował się **4 ml** roztworu skrobi to możemy powiedzieć, że w warunkach naszego doświadczenia **A<sub>620</sub> próby kontrolnej** odpowiada ilości wiązań glikozydowych = **0,000124 M (124 μmola)**.

2. Obliczamy różnice pomiędzy absorbancją próbki kontrolnej a absorbancjami poszczególnych próbek badanych (A<sub>K</sub> - A<sub>B1</sub>; A<sub>K</sub> - A<sub>B2</sub>; itd.). Różnice te są wprost proporcjonalne do ilości rozłożonych wiązań glikozydowych:

$$\begin{array}{l} A_K \text{ ----- } 124 \mu\text{mola wiązań} \\ A_K - A_{B1} \text{ ----- } X \mu\text{moli wiązań rozłożonych w próbce} \end{array}$$

stąd:

$$X = \frac{A_K - A_B}{A_K} \cdot 124$$

X — to ilość mikromoli wiązań glikozydowych rozłożonych w próbce w ciągu 15 minut pod wpływem α-amylazy zawartej w 1 ml preparatu leku rozcieńczonego „z” razy.

Pamiętając o tym, że jedną kapsułkę leku rozpuszczono w 100 ml buforu, aktywność α-amylazy zawartej w 1 kapsułce można obliczyć następująco:

$$A = \frac{X \cdot z \cdot 100}{15}$$

Do wzoru należy podstawić wyliczone wcześniej wartości X (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> itd.) i pomnożyć przez odpowiednie rozcieńczenie „z” (15, 20, 25 itd.), a następnie wyliczyć wartość średnią czyli aktywność α-amylazy zawartej w 1 kapsułce leku Kreon.

### **Literatura:**

- 1) Praktikum z biochemii. Praca zbiorowa pod red. A. Dubina i B. Turyny. Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 1999.
- 2) Ćwiczenia z biochemii. Praca zbiorowa pod red. L. Kłyszajko-Stefanowicz. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.
- 3) Podstawy biochemii. J. Kączkowski. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2005.
- 4) Biochemia. Krótkie wykłady. Hames B.D. i Hooper N.M. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2002.