



Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny



ENZYMOLOGIA

Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

**Centrum Bioimmobilizacji
i Innowacyjnych Materiałów
Opakowaniowych**



ul. Klemensa Janickiego 35
71-270 Szczecin



Ćwiczenie 6

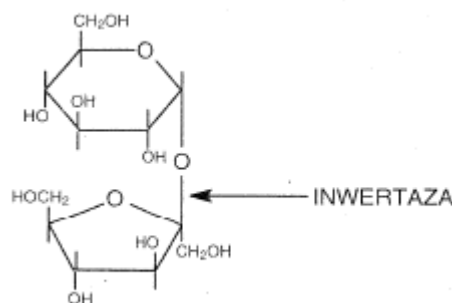
Inwertaza

**Izolowanie enzymu
i wykrywanie jego aktywności**

Ćwiczenie 6.

Inwertaza – izolowanie enzymu i wykrywanie jego aktywności

Inwertaza (sacharaza, β -fruktofuranazydaza) - enzym należący do grupy hydrolaz, został po raz pierwszy wyizolowany z ekstraktu drożdży przez Berthelota w 1860 roku. Hydrolizuje wiązania glikozydowe utworzone z udziałem grupy hydroksylowej w położeniu β , związanej z węglem anomerycznym (C2) pierścienia fruktofuranozy. Sacharaza powoduje hydrolizę dwucukru sacharozy do glukozy i fruktozy, trójcukru rafinozy do fruktozy i dwucukru melibiozy. Głównym, naturalnym substratem β -fruktofuranazydazy jest sacharaza (Rys.1). Inwertazy występują w bakteriach i innych mikroorganizmach, w roślinach wyższych (w ścianie komórkowej) i u zwierząt. Przez pszczoły sacharaza wykorzystywana jest do hydrolizy sacharozy podczas produkcji miodu. U ludzi inwertaza, podobnie jak laktaza, występuje na wewnętrznej powierzchni komórek nabłonka wyściełającego jelito cienkie. Bogatym źródłem inwertazy są drożdże. Inwertaza drożdżowa wykazuje optimum działania w pH 4.0—5.5. Aktywność enzymatyczną inwertazy można oznaczyć różnymi metodami np. metodą kolorymetryczną lub polarymetryczną.



Rys.1. Sacharaza (α -D-glukopiranozylo- β -D-fruktofuranozyd) z zaznaczonym miejscem działania inwertazy (Dubin i Turyna, 1999)

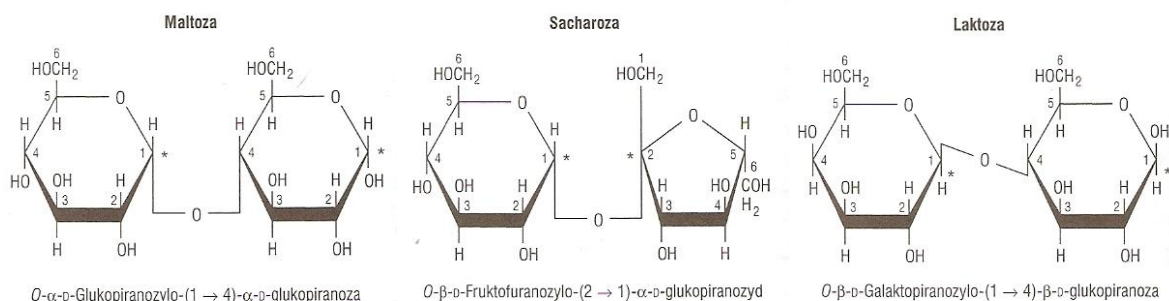
Sacharaza to disacharyd zbudowany z α -D-glukozy i β -D-fruktozy połączonych wiązaniem glikozydowym 1-2. W większych ilościach występuje w burakach cukrowych i trzcinie cukrowej. Nie posiada właściwości redukujących.

Zastosowanie sacharazy w technologii żywności

Sacharaza otrzymywana jest głównie z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Enzym ten może być stosowany w produkcji cukierniczej, do przygotowania syropów cukru inwertowanego używanego do wyrobu sztucznego miodu, cukierków, marmolad, konfitur, likierów itp.

Próby redukcyjne cukrów stanowią podstawę najczęściej stosowanych jakościowych i ilościowych metod ich oznaczania. Wszystkie cukry proste wykazują w środowisku alkalicznym właściwości redukujące co jest związane z obecnością w otwartej konfiguracji łańcuchowej cukru wolnej grupy aldehydowej (aldozy) lub ketonowej (ketozy). Właściwości redukujące dwucukrów są uwarunkowane typem wiązania glikozydowego. Zazwyczaj w wiązanie jest włączony anomeryczny atom węgla tylko jednego z monosacharydów. Taki disacharyd ma wówczas jeszcze jedną wolną grupę aldehydową lub ketonową o właściwościach redukujących (np. laktoza, maltoza) (Rys. 2). Natomiast, gdy oba anomeryczne atomy węgla tworzą wspólne wiązanie, taki disacharyd jest cukrem nieredukującym (np. sacharoza) i dopiero po hydrolizie (kwasowej lub enzymatycznej) powodującej rozbitcie wiązania glikozydowego pojawiają się właściwości redukcyjne poszczególnych składników cukrowych. Hydrolizę sacharozy nazywa się inwersją (stąd nazwa enzymu – inwertaza), ponieważ w jej wyniku otrzymuje się zmianę kierunku skręcalności płaszczyzny światła spolaryzowanego. Sacharoza skręca w prawo, a produkt jej hydrolizy – cukier inwertowany – w lewo.

Istotą prób redukcyjnych jest utlenienie cukru przez związek, który sam ulega wówczas redukcji. Zasada ta została wykorzystana w reakcji cukrów z odczynnikami Fehlinga, Benedicta i Nylandera.



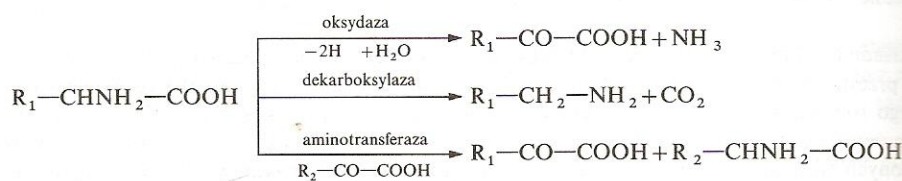
Rys. 2. Struktura wybranych disacharydów. Przedrostek α i β odnosi się do konfiguracji przy anomerycznym atomie węgla (*). Jeżeli anomeryczny atom węgla drugiej reszty uczestniczy w tworzeniu wiązania glikozydowego, jak w sacharozie, to taką resztę glikozydową nazywa się furanozydem lub piranozydem. Disacharyd, który nie posiada wolnej potencjalnej grupy aldehydowej lub ketonowej przy anomerycznym atomie węgla nie wykazuje właściwości redukujących. Maltoza i laktoza są cukrami redukującymi; na rycinie zostały przedstawione odpowiednio w formach α i β (Murray i in. 2010)

Próba Benedicta należy do najbardziej specyficznych i czułych prób pozwalających wykryć obecność cukrów redukujących. Występowanie w cząsteczce wolnej grupy aldehydowej lub ketonowej nadaje jej własności redukujące. Właściwości redukujące cukrów ujawniają się tylko w środowisku zasadowym, ponieważ w środowisku kwaśnym wolna grupa karbonylowa jest zablokowana ponieważ włącza się w budowę pierścienia. Do wykrywania cukrów

redukcujących stosuje się różne cząsteczki i jony: jod, jony metali ciężkich, jon żelazicyjankowy. W próbie Benedicta wykorzystuje się jony Cu (II), które pod wpływem cukrów redukujących tworzą Cu (I) dając w alkalicznym środowisku pomarańczowej barwy Cu₂O.

Specyficzność działania enzymów. Najważniejszą cechą enzymów, odróżniającą je od innych katalizatorów, jest duża ich **swoistość wyrażająca się katalizowaniem reakcji chemicznej określonego typu i ograniczonej tylko do określonej budowy substratu.**

Swoistość kierunku działania. Enzym ma zdolność wybierania i katalizowania tylko jednej reakcji spośród wielu możliwych. Energia aktywacji dla tej reakcji zostanie tak obniżona, że bardzo szybko ustala się stan równowagi. Zjawisko to wyraża specyficzność działania enzymu. Enzym katalizuje tylko jedno z wielu termodynamicznie możliwych przekształceń danej substancji. Inny enzym, o innej specyficzności działania, wyzwała inną reakcję, np.:



Specyficzność substratowa. Specyficzność w stosunku do substratu oznacza możliwość wyboru przez dany enzym lub grupy strukturalnie podobnych związków, z którymi wchodzi w kompleks zdolny do dalszej reakcji. Specyficzność enzymu wobec substratu może być bardzo duża. Najważniejszym jej wyrazem jest zdolność kierowania przemianą tylko jednego izomeru optycznego. W mieszaninie racemicznej DL-substratu pod wpływem enzymu o bezwzględnej swoistości przestrzennej zostaje przekształcony tylko jeden izomer przestrzenny. W reakcji odwrotnej syntetyzowany jest również tylko jeden izomer, podczas gdy ta sama reakcja w syntezie nieenzymatycznej daje mieszaninę racemiczną. Przykładem jest enzymatyczna redukcja pirogronianu do L-mleczanu. Podobny rodzaj specyficzności istnieje w odniesieniu do izomerów przestrzennych *cis* (Z)-*trans* (E). Enzym fumaraza działa tylko na fumarany, a nie przekształca maleinianów.

4.1.1.



Są enzymy, które mają małą specyficzność, np. lipazy kierują hydrolizą wiązań estrowych niezależnie od rodzaju alkoholu i kwasu tworzącego substrat. Enzymem o większej swoistości

jest maltaza, która hydrolizuje wiązania α -glukozydowe D-glukozy w maltozie, natomiast nie działa na wiązania β -glukozydowe i na cukrowce nie zawierające D-glukozy. Natomiast sacharaza katalizuje hydrolizę wszystkich oligosacharydów zawierających resztę β -D-fruktofuranozy, takich jak sacharoza, rafinoza i inne (hydroliza wiązań β -glukozydowych). Pepsyna rozbija najchętniej wiązania peptydowe utworzone przez grupy aminowe aminokwasów aromatycznych, leucyny i aminokwasów kwasowych. Natomiast trypsina hydrolizuje wiązania peptydowe, w które zaangażowane są grupy karboksylowe L-argininy i L-lizyny. Obie te peptydazy „rozpoznają” nie tylko rodzaj wiązania, ale również budowę aminokwasów sąsiadujących z hydrolizowanym wiązaniem.

Izolowanie i oczyszczanie enzymów

W izolowaniu i oczyszczaniu enzymów stosuje się metody pozwalające na otrzymanie ich w stanie jednorodnym i bez utraty aktywności katalitycznej. Enzymy są przeważnie nietrwałe w pH poniżej 5 i powyżej 9, ulegają łatwo denaturacji cieplnej i powierzchniowej (podczas pienia się roztworów) oraz inaktywują się w obecności soli metali ciężkich, dlatego też ich preparatykę przeprowadza się w buforach o pH ok. 7, w niskich temperaturach, stosując wodę podwójnie destylowaną i środki kompleksujące metale ciężkie oraz w razie potrzeby związki tiolowe.

Rozpuszczalne enzymy - szczególnie te, które znajdują się w cytoplazmie - łatwo można ekstrahować wodą lub rozcieńczonymi roztworami soli o wartościach pH oddalonych od ich punktu izoelektrycznego. Ekstrakcję enzymu przeprowadza się zwykle po rozdrobnieniu tkanek w homogenizatorze. Aby oddzielić enzymy mocno wbudowane w ziarnistość komórek oraz w kompleksy białkowe, lipidowe i wielocukrowe, trzeba stosować dodatkowo takie sposoby, jak zamrażanie i odtajanie, ekstrakcję butanolem, wprowadzenie środków zmniejszających napięcie powierzchniowe, np. detergentów itp.

Metody oczyszczania i frakcjonowania enzymów są bardzo różnorodne i rozpuszczalnikami organicznymi, głównie acetonem, etanolem w niskiej temperaturze lub eterem. Zastosowanie ponadto chromatografii, elektroforezy czy ultrawierwienia pozwala oczyścić prawie każdy enzym. Duże możliwości otrzymywania jednorodnych preparatów enzymatycznych stworzył rozwój chromatografii powinowactwa. Ostatnim etapem oczyszczania może być krystalizacja, której wielokrotne powtórzenie zwykle dostarcza preparatów o dużej aktywności. Enzymy typu albumin łatwo krystalizują przez dosycenie roztworów siarczanem amonu w odpowiedniej temperaturze i pH, a enzymy typu globulin można wykrystalizować przez dializę wobec wody. Niekiedy można spowodować krystalizację przez dodanie środka odciągającego wodę (etanol lub aceton).

Część doświadczalna

Ćwiczenie 6.

Inwertaza – izolowanie enzymu i wykrywanie jego aktywności

1) OTRZYMYWANIE PREPARATU INWERTAZY Z DROŻDŻY

- 4 g drożdży rozcierać w **moździerzu** z piaskiem (8 g), przez 5 min., następnie dodać około 20 ml wody i ponownie dokładnie rozetrzeć.
- Odwirować w temp. 20°C, przez 10 min. przy 5 000 obr/min. (program 9).
- Zmierzyć za pomocą **cylindra miarowego** objętość supernatantu (cieczy nadosadowej).
- Do innego **cylindra miarowego** odmierzyć 5-krotną objętość acetonu i przelać do **butelki z tworzywa sztucznego**.
- Supernatant również przelać do **butelki**, w której znajduje się już aceton.
- Butelkę mocno zakręcić, zawartość dokładnie **wymieszać przez intensywne wytrząsanie** w czasie ok. 10 sekund.
- Zawartość butelki przelać do zlewki nr 1 i odczekać 3 minuty na wytrącenie się osadu.
- Odwirować w temp. 20°C, przez 2 min. przy 2 000 obr/min. (program 8)
- Supernatant (aceton) przelać do znajdującej się na stanowisku butelki zawierającej aceton a do falkonów z osadem dodać po 3 ml wody destylowanej.
- Odwirować w temp. 20°C, przez 10 min. przy 5 000 obr/min. (program 9)

2) WYKRYWANIE AKTYWNOŚCI WYIZOLOWANEGO ENZYMU

- **Próba kontrolna – reakcja Benedicta**
 - a) Przygotować 4 próbowki. Do pierwszej należy dodać 2 ml 1% sacharozy, do drugiej 2 ml wody destylowanej, do trzeciej 2 ml 1% laktozy, do czwartej 2 ml 1% skrobi.
 - b) Do każdej próbowki dodać 1 ml odczynnika Benedicta.
 - c) Wstawić próbowki do wrzącej wody (na ok. 5 min.).

Wyjaśnienie:

Cukry redukujące redukują miedź (II) z odczynnika Benedicta do miedzi (I). Powstający w reakcji osad Cu_2O ma różne zabarwienie (od zielonego, przez żółty do pomarańczowego, a nawet czerwonego), w zależności od stężenia cukrów redukujących w próbce. Zanotować i zinterpretować wyniki.

Wyniki zapisz w tabeli: Obecność cukrów redukujących w badanych próbkach przed dodaniem inwertazy (+/-)

Schemat doświadczenia

Numer próbówki	1	2	3	4
Substrat (2 ml)	sacharoza	woda	laktoza	skrobia
Odczynnik (1 ml)	odczynnik Benedicta			
Wynik próby (+ lub -)				

- **Właściwa próba**

- Przygotować 4 próbówki. Do pierwszej należy dodać 2 ml 1% sacharozy, do drugiej 2 ml wody destylowanej, do trzeciej 2 ml 1% laktozy, do czwartej 2 ml 1% skrobi.
- Do każdej próbówki dodać 2 ml otrzymanej inwertazy i inkubować w 37°C przez 10 minut.
- Do każdej próbówki dodać 1 ml odczynnika Benedicta.
- Wstawić próbówki do wrzącej wody (na ok. 5 min.).

Wyjaśnienie:

Cukry redukujące redukują miedź (II) z odczynnika Benedicta do miedzi (I). Powstający w reakcji osad Cu_2O ma różne zabarwienie (od zielonego, przez żółty do pomarańczowego, a nawet czerwonego), w zależności od stężenia cukrów redukujących w próbce. Zanotować i zinterpretować wyniki.

Wyniki zapisz w tabeli: Obecność cukrów redukujących w badanych próbkach po dodaniu inwertazy (+/-)

Schemat doświadczenia

Numer próbówki	1	2	3	4
Substrat (2 ml)	sacharoza	woda	laktoza	skrobia
Enzym (2 ml)	inwertaza	inwertaza	inwertaza	inwertaza
Odczynnik (1 ml)	odczynnik Benedicta			
Wynik próby (+ lub -)				

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) Biochemia Harpera ilustrowana. Murray R., Granner D., Rodwell V. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2010.
- 4) Ogólna technologia żywności. Pijanowski E., Dłużewski M., Dłużewska A., Jarczyk A. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2004.