



BIOCHEMIA

Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

**Centrum Bioimmobilizacji
i Innowacyjnych Materiałów
Opakowaniowych**



ul. Klemensa Janickiego 35
71-270 Szczecin



Enzymy. Oznaczanie aktywności wybranych enzymów

**Ćwiczenie 8
Trypsyna**

**Ćwiczenie 9
Lipaza**

Wprowadzenie

Reakcje chemiczne w organizmie są zawsze przyspieszane przez swoiste katalizatory komórkowe, zwane biokatalizatorami lub enzymami. Enzymy nie zmieniają końcowego składu mieszaniny reagującej ani stałej równowagi danej reakcji, przyspieszają jedynie osiągnięcie stanu równowagi w reakcjach termodynamicznie możliwych. Są to reakcje egzoergiczne, którym towarzyszy utrata energii swobodnej (ΔG ma znak ujemny).

Enzymy są złożonymi, wielkocząsteczkowymi katalizatorami o charakterze białkowym wytwarzanymi wyłącznie przez żywe komórki (ale mogą działać poza komórkami) i odznaczającymi się dużą swoistością w przyspieszaniu lub nadawaniu odpowiedniego kierunku reakcjom chemicznym. Pod względem chemicznym wszystkie poznane dotąd enzymy należą do białek prostych lub złożonych. Zasadniczą częścią składową enzymów jest tzw. grupa czynna, warunkująca łączenie się enzymu z substratem.

Ze względu na **budowę chemiczną** wyróżnia się 3 kategorie enzymów:

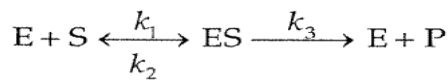
1) Enzymy jako **białka proste zbudowane tylko z aminokwasów**. Rolę grupy czynnej spełniają specyficzne zespoły aminokwasów, których nie można odszczepić bez zmiany struktury białka, a więc bez zniszczenia enzymu jako substancji katalitycznej. Należą tu enzymy proteolityczne oraz amylaza, ureaza, aldolaza, czy RNaza.

2) Enzymy jako **białka złożone**, zawierające **nieaminokwasowe grupy chemiczne trwale związane z cząsteczką białkową, tzw. grupy prostetyczne**. Oddzielenie ich i ponowne złączenie nie zawsze prowadzi do odtworzenia katalitycznie czynnego enzymu. Należą tu takie enzymy, jak np. oksydaza cytochromowa, katalaza lub peroksydaza, w których grupą prostetyczną, spełniającą rolę czynnej grupy katalitycznej jest żelazoporfiryna.

3) Enzymy należące do **białek złożonych**, zawierające **nieaminokwasowe grupy związane luźno z cząsteczką białkową**, których nie można traktować jako integralnych części enzymów na podobieństwo grup prostetycznych. Obie części składowe dają się łatwo od siebie oddzielić (m.in. pomocą zwykłej dializy) i każda z nich jest katalitycznie nieczynna, a złączone ze sobą (np. dializat z pozostałością) dają ponownie aktywny enzym. Takie grupy chemiczne nazywane są **koenzymami**; część białkowa zwie się wówczas **apoenzymem**, a całość, czyli aktywny enzym - **holoenzymem**.

Należą tu m.in. dehydrogenazy, których koenzymem może być dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (NAD^+) lub jego fosforan ($NADP^+$).

Enzym (E) wiąże się ze swym **substratem (S)** tworząc **kompleks enzym-substrat (ES)**. Kompleks ES może dysocjować z powrotem do E + S lub przekształcić się w sam E i produkt P. Stałe szybkości k_1 , k_2 , k_3 opisują szybkości przebiegu każdego etapu katalitycznego. Przyjmuje się, iż reakcja odwrotna, w której enzym i produkt (E + P) byłyby przekształcane w kompleks ES, przebiega z tak małą szybkością, że reakcję tę można pominąć.



Tylko niewielka część łańcucha białkowego decyduje o katalitycznych właściwościach enzymu. Najistotniejszym elementem budowy enzymów, któremu zawdzięczają aktywność katalityczną, jest **centrum aktywne**. Jest to zgrupowanie właściwych reszt aminokwasowych o odpowiednim ułożeniu przestrzennym i potencjalnej ruchomości. Z tymi właśnie grupami połączy się substrat.

Reszty aminokwasowe wchodzące w skład centrum aktywnego mogą należeć do aminokwasów odległych w sekwencji łańcucha polipeptydowego, a zbliżonych do siebie dzięki jego pofałdowaniom; dlatego czynniki oddziałujące na przestrzenną budowę enzymu mają wpływ na jego funkcję. Większość zmian w konformacji cząsteczek enzymu (struktura II-, III- i IV-rzędowa) prowadzi do utraty możliwości katalitycznych.

Klasyfikacja i nazewnictwo enzymów. Swoistą cechą odróżniającą każdy enzym jest katalizowana przez niego reakcja chemiczna i właśnie ona jest podstawą klasyfikacji i nomenklatury enzymów (bierze się pod uwagę pełną, sumaryczną reakcję przedstawioną odpowiednim równaniem). Reakcja ta łącznie z nazwą substratu (substratów) służy za podstawę terminologii poszczególnych enzymów. Enzymy mają z reguły dwie nazwy: systematyczną i potoczną. Nazwa systematyczna musi być tworzona według określonych reguł, powinna identyfikować dany enzym i określać jego działanie.

Nazwy potoczne są zwykle krótkie i często tworzone od nazw substratu, m.in. deoksyrybonukleaza, arginaza, amylaza, lipaza, ureaza. Niektóre nazwy potoczne, mimo braku racjonalnego uzasadnienia, utrzymały się ze względu na tradycję, np. pepsyna, trypsyna, chymotrypsyna.

Komisja Enzymowa Międzynarodowej Unii Biochemicznej opracowała w 1961 r. zasady klasyfikacji i nazewnictwa enzymów. Według przyjętych zasad, enzymy i katalizowane reakcje podzielono na **sześć klas głównych**:

- 1. Oksydoreduktazy** — katalizują odwracalne reakcje utleniania i redukcji, a więc przemiany związane z przeniesieniem protonów i elektronów,
- 2. Transferazy** — katalizują odwracalne reakcje przeniesienia grup funkcyjnych z donora na akceptor,
- 3. Hydrolazy** — katalizują nieodwracalne reakcje hydrolizy, a więc rozpadu wiązań z jednoczesnym przyłączeniem się jednej cząsteczki wody na każde wiązanie ulegające rozpadowi,
- 4. Liazy** — katalizują niehydrolityczny rozpad wiązań (bez pobrania i wydzielania ubocznych produktów), niektóre reakcje są odwracalne

5. Izomerazy — katalizują reakcje przekształceń strukturalnych w obrębie cząsteczki — reakcje odwracalne

6. Ligazy czyli syntetazy — katalizują syntezę trwałych wiązań kowalencyjnych, (np. C-C, C-N, C-S, C-O), z wykorzystaniem wiązań makroergicznych ATP

Każdy enzym ma **numer międzynarodowej klasyfikacji (EC)**, składający się z 4 członów oddzielonych kropkami:

Człon I oznacza numer **klasy**, do której należy enzym.

Człon II - to **podklasa**.

Człon III - to **pod-podklasa**.

Człon IV - to **kolejny numer enzymu** w jego pod-podklasie.

Wśród czynników wpływających na szybkość reakcji enzymatycznych wymienić należy:

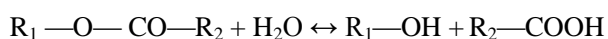
- stężenie substratu,
- stężenie enzymu,
- temperaturę,
- pH środowiska (więcej informacji → Ćwiczenie 7),
- obecność aktywatorów,
- obecność inhibitorów.

Hydrolazy. Do **hydrolaz (klasa 3)** zalicza się enzymy katalizujące proces rozpadu substratu z udziałem cząsteczek H₂O. 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 .

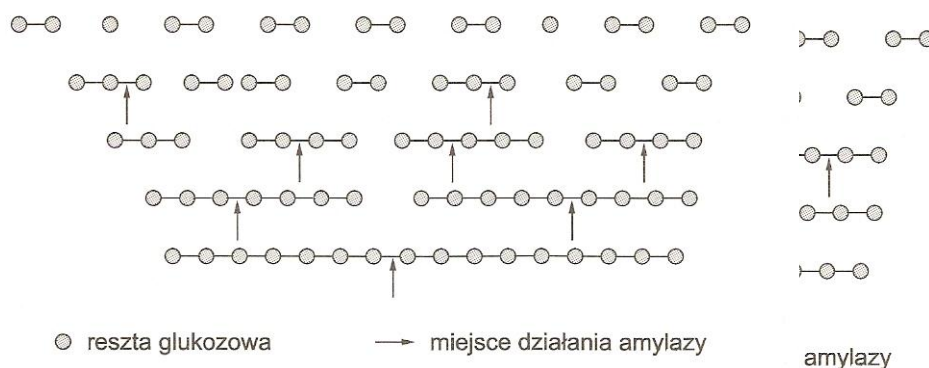
1. Hydrolazy estrów. **Lipaza** jest enzymem katalizującym hydrolizę tłuszczów do glicerolu i kwasów tłuszczowych według schematu:



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 zemulgowaniu 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 → część doświadczalna Ćwiczenia nr 9).

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 (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)

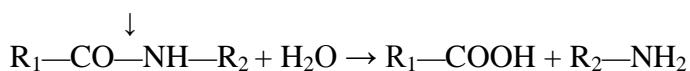
Amylaza ślinowa wykazuje aktywność w roztworach lekko zasadowych, obojętnych i kwasowych. Optymalne pH działania: 6,6. Bardzo duży wpływ na działanie amylazy śliny wywierają elektrolity (Cl^- , Br^- , NO_3^-). Usunięcie chlorków ze śliny inaktywuje amylazę

(więcej informacji na temat amylazy ślinowej można znaleźć w Ćwiczeniu nr 7).

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 hydrolitycznie 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, są enzymami, które hydrolizują wiązania peptydowe (utworzone wyłącznie przez określone aminokwasy) znajdujące się wewnątrz cząsteczki białka czy peptydu rozkładając go na mniejsze fragmenty i należą do nich pepsyna, tripsyna, chymotrypsyna. Do endopeptydaz roślinnych zaliczane są m.in. papaina, bromelanina, aktynidyna czy ficyna.

Egzopeptydazy są enzymami, które hydrolizują wiązania peptydowe znajdujące się na C- lub N-końcu białka, odszczepiające pojedyncze aminokwasy. Karboksypeptydazy są enzymami odszczepiającymi aminokwas na C końcu peptydu (wykazują specyficzność w stosunku do sąsiedniego wolnego ładunku ujemnego grupy karboksylowej), natomiast aminopeptydazy są enzymami odszczepiającymi aminokwas na N końcu peptydu (wykazują specyficzność w stosunku do sąsiedniego wolnego ładunku dodatniego grupy aminowej).

Znana jest także wybiórczość niektórych enzymów w stosunku do budowy reszt aminokwasów tworzących rozkładane wiązanie peptydowe. Preparaty enzymów proteolitycznych pozakomórkowych i wewnątrzkomórkowych są z reguły mieszaninami enzymów o różnej specyficzności i dzięki temu białka rozkładają się z ich udziałem do wolnych aminokwasów.

Szybkość hydrolizy poszczególnych białek nie jest jednakowa i zależy od liczby i układu wiązań innych niż peptydowe, które mogą utrudniać dostęp peptydaz, a także od zwartości cząsteczek białkowych. Dlatego białka zdenaturowane, a więc o częściowo rozerwanych

wiązaniach niepeptydowych, głównie disulfidowych i wodorowych, są trawione łatwiej.

Budowa centrum katalitycznego. Wśród enzymów proteolitycznych występuje kilka grup o zróżnicowanej budowie centrum katalitycznego, a więc i mechanizmie działania, i na tym polega inny rodzaj ich klasyfikacji; wyróżnia się:

- **proteazy karboksylowe** (proteazy kwasowe, aspartyłowe) zawierające w centrum aktywnym 2 grupy karboksylowe, zarówno w charakterze grupy nukleofilowej, jak i dawcy protonu; działają one z reguły w środowisku o małym pH np. pepsyna, podpuszczka, katepsyna IV, niektóre enzymy wewnątrzkomórkowe zwierzęce oraz grzybowe,

- **proteazy serynowe** – zawierają w centrum aktywnym serynę (często zestryfikowaną przez fosforan) oraz histydynę, jako dawcę ładunku dodatniego; hamowane przez diizopropylodifluorofosforan (DIFP) np. trypsyna, chymotrypsyna, elastaza, trombina (enzym układu krzepnięcia krwi),

- **proteazy cysteinowe** (zwane inaczej tiolowymi lub sulfhydryłowymi) – zawierające w centrum aktywnym grupę tiolową cysteiny (-SH) w bezpośrednim sąsiedztwie pierścienia imidazolowego His; inaktywowane przez *p*-chlorortęciobenzoatan (**p-chloromercuric benzoate** - PCMB) np. katepsyna II, enzymy roślinne: papaina, bromelaina, ficyna i aktynidyna oraz niektóre proteiny bakteryjne (klostripaina),

Endoproteiny cysteinowe mają szczególne znaczenie w metabolizmie, np. wywołanej stresem aktywacji białek (niska lub wysoka temperatura, deficyt wody, zasolenie). Również istotne znaczenie mają w inicjowaniu kiełkowania nasion, ze względu na zdolność redukcyjnego, wstępnego degradowania białek zapasowych.

- **metaloproteazy** – których aktywność zależna jest od obecności określonych jonów metali (cynku, wapnia czy manganu) np. karboksypeptydaza A i B, bakteryjna termolizyna czy kolagenaza.

Jak każde białko, peptydazy produkowane są w komórkach, ale jedne z nich działają wewnątrz komórki, natomiast inne wykazują aktywność enzymatyczną poza komórką i dlatego proteazy dzieli się również na:

- 1) **enzymy wewnątrzkomórkowe,**

- 2) **enzymy pozakomórkowe (zewnątrzkomórkowe).**

Wewnątrzkomórkowymi protezami są zwierzęce katepsyny (umiejscowione głównie w lizosomach). Katepsyny w szczególnie dużych ilościach występują w lizosomach komórek nerek, śledziony i tkanek nowotworowych, a także tkanki mięśniowej. Enzymy te biorą udział w katabolizmie białek komórki i największą aktywność proteolityczną przejawiają w pH 4-5.

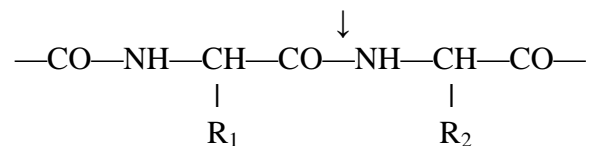
Wewnątrzkomórkowymi protezami roślinnymi są: papaina (z soku mlecznego drzewa melonowego), bromelaina (z łodyg ananasa i soku ananasa), aktynidyna (z owocu kiwi) czy ficyna (z soku fig). Ich optimum działania przypada na pH 5-7.

Enzymy pozakomórkowe są to enzymy, które występują we krwi i innych płynach pozakomórkowych pełniąc tam różnorodne funkcje np. biorą udział w krzepnięciu krwi, fibrynolizie, aktywacji czynników dopełniających. Proteazami tego typu są także enzymy układu pokarmowego (enzymy trawienne); do grupy tej należą głównie typowe endopeptydazy:

- enzymy soku żołądkowego - pepsyna i podpuszczka,
- enzymy soku trzustkowego - trypsina, chymotrypsyna, karboksypeptydaza i elastaza.

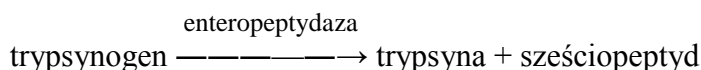
Zgodnie z racjonalną klasyfikacją i nomenklaturą endopeptydazy zaliczane są do hydrolaz peptydylopeptydowych. Enzymom tym przypada zapoczątkowanie procesu trawienia białek w przewodzie pokarmowym.

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:



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.

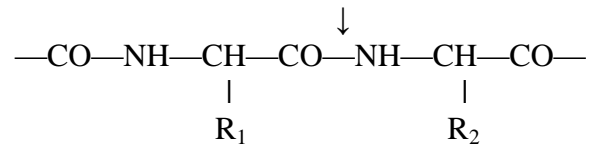


Powstała trypsina aktywuje z kolei dalszą porcję trypsynogenu (aktywacja katalityczna).

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:

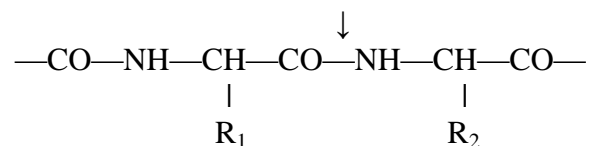


gdzie: R_1 – reszta lizyny lub argininy, R_2 – reszta dowolnego aminokwasu.

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).

Chymotrypsyna jest również wydzielana w postaci nieczynnej - chymotrypsynogenu, z którego pod wpływem trypsyny powstaje czynna chymotrypsyna. Hydrolizuje ona specyficznie wiązania peptydowe, w które zaangażowana jest grupa karboksylowa aminokwasów aromatycznych:



gdzie: R_1 – reszta tyrozyny, fenyloalaniny lub tryptofanu, R_2 – reszta dowolnego aminokwasu.

Optymalne pH dla działania chymotrypsyny wynosi 8-9. Enzym ten wykazuje ponadto silną zdolność ścinania mleka, ale nie przyspiesza krzepnięcia krwi (trypsyna na odwrót).

Część doświadczalna

Ćwiczenie 8. Trypsyna

Oznaczanie szybkości reakcji trawienia żelatyny przez trypsynę (miareczkowanie formolowe)

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest poznanie metody oznaczania aktywności enzymów proteolitycznych na przykładzie trypsyny (czas badania wynosi 50 minut).

Zasada metody:

W miarę postępowania hydrolizy białka przez trypsynę pojawia się w roztworze coraz więcej grup karboksylowych, które po uprzednim zablokowaniu grup aminowych przez formaldehyd można oznaczyć ilościowo, miareczkując wodorotlenkiem sodowym wobec fenoloftaleiny (miareczkowanie metodą Sørensen, miareczkowanie formolowe). Ilość zasady zużytej do miareczkowania jest więc miarą stopnia zhydrolizowania białka. Liczba uwolnionych grup karboksylowych jest równa liczbie związanych z formaldehydem grup aminowych.

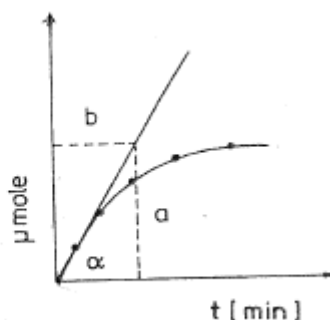
Wykonanie

1. Pastylkę aptecznego preparatu trzustki utrzeć w moździerzu z 7 ml węgla sodu.
2. Do kolbki o obj. 100 cm³ nalać 4 ml formaliny.
3. Do próbki typu Falcone o obj. 50 cm³ odmierzyć 16 ml 4% roztworu żelatyny i 4 ml przygotowanego roztworu preparatu trzustki. Natychmiast po zmieszaniu pobrać 2 ml mieszaniny i przenieść do przygotowanej w punkcie 2 kolbki o obj. 100 cm³ zawierającej 4 ml formaliny (próbka kontrolna).
4. Probówkę zawierającą mieszaninę żelatyny z preparatem trzustki wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C i rozpocząć pomiar czasu. Uwaga! Zawartość próbki należy intensywnie mieszać co ok. 3 min.
5. Do próbki kontrolnej dodać 5 kropel fenoloftaleiny i miareczkować 0,02 M roztworem NaOH.
6. Przygotować 5 kolbek o obj. 50 cm³ i nalać do nich po 4 ml formaliny.
7. Kolejne próbki (po 2 ml) z inkubowanej próbki zawierającej mieszaninę żelatyny i preparatu trzustki pobierać po 10, 20, 30, 40 i 50 minutach. Po pobraniu poszczególnych próbek postępować jak w przypadku próbki kontrolnej, czyli miareczkować 0,02 M roztworem NaOH w obecności 5 kropel fenoloftaleiny.

Opracowanie wyników

1. Ilość zużytego do miareczkowania 0,02 M roztworu NaOH przeliczyć na ilość mikromoli wiązanych protonów grup karboksylowych:
1 ml 0,02 M roztworu NaOH odpowiada 20 μmol grup karboksylowych (-COOH).
2. Po odjęciu ilości μmol grup karboksylowych (ilości ml 0,02 M roztworu NaOH) przypadających na próbę kontrolną, wyniki przedstawić w postaci wykresu zależności między ilością uwalnianych grup karboksylowych, a czasem inkubacji (na osi odciętych – czas w minutach, na osi rzędnych μmole uwalnianych grup karboksylowych).
3. Z wykresu należy wyznaczyć szybkość początkową (v_0) reakcji enzymatycznej. W tym celu należy przeprowadzić styczną do krzywej w punkcie $t = 0$. Styczna z osią odciętych utworzy kąt α , którego tangens jest miarą szybkości początkowej (v_0). Wartości $\text{tg } \alpha$ nie wolno odczytywać z tablic na podstawie wartości kąta w stopniach, ponieważ nanoszone na osi odciętych i rzędnych wartości nie są tej samej wielkości. Oblicza się go ze stosunku wielkości przyprostokątnej przeciwległej do kąta α , podanej w wartościach odkładanych na osi rzędnych (w μmole uwalnianych grup karboksylowych), do przyprostokątnej przyległej do kąta α , podanej w wartościach odkładanych na osi odciętych (czas w minutach).

$$v_0 = \text{tg } \alpha = \frac{a \text{ } \mu\text{mole}}{b \text{ czas}}$$



Ćwiczenie 3

Lipaza. Oznaczanie aktywności enzymu metodą miareczkową

Lipazy to grupa enzymów o stosunkowo niskiej swoistości działania. Lipazy triacygliceroli spełniają w organizmie dwie podstawowe funkcje:

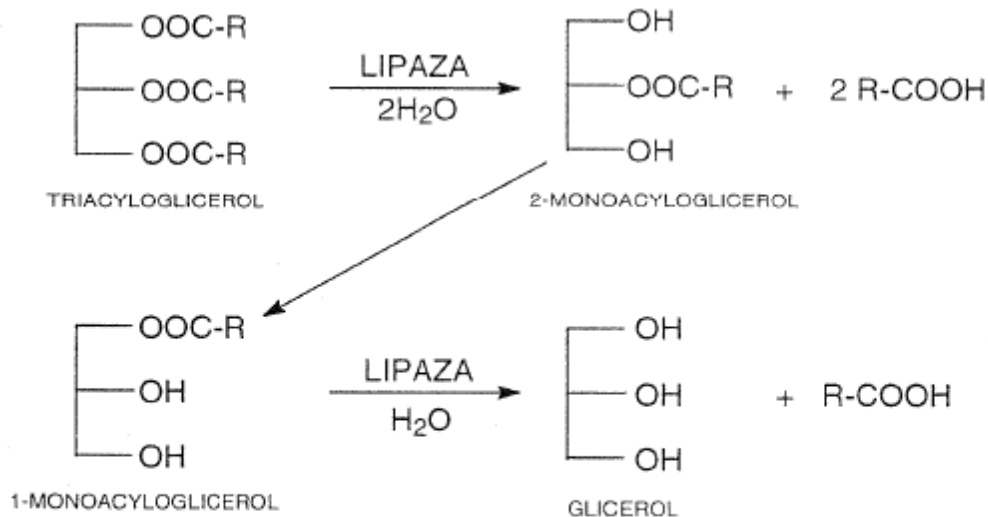
- są enzymami trawiennymi hydrolizującymi lipidy do związków, które mogą być wchłaniane w przewodzie pokarmowym,
- lipazy występujące w tkance tłuszczowej umożliwiają wykorzystywanie zgromadzonych tam lipidów jako źródło energii. Aktywność lipaz znajdujących się w komórkach tłuszczowych jest regulowana hormonalnie: adrenalina, noradrenalina, glukagon i ACTH poprzez aktywację cyklicznej adenylanowej i wzrost stężenia cAMP w komórce aktywuje kinazę białkową A, która fosforyluje a przez to aktywuje lipazę. Insulina prowadzi do obniżenia poziomu cAMP w komórkach tłuszczowych i hamuje lipolizę.

Lipazy są jedną z głównych grup enzymów trawiennych. Choć istnieje lipaza „językowa” – wydzielana przez gruczoły języka oraz lipaza żołądkowa, to jednak główny ciężar spada na hydrolizę lipidów przypada na lipazę trzustkową. Aktywność tego enzymu nie jest regulowana hormonalnie; natomiast wzrasta ona w obecności soli kwasów żółciowych, fosfolipidów i białka – kolipazy. W wyniku całkowitej hydrolizy triacygliceroli powstają glicerol i kwasy tłuszczowe. Jednak lipaza trzustkowa jest enzymem działającym specyficznie na pierwszorzędowe wiązania estrowe – to znaczy, że w pierwszym rzędzie odszczepia kwasy tłuszczowe znajdujące się w pozycji 1 i 3 triacygliceroli. Powstały 2-monoglicerol może ulec izomeryzacji z wytworzeniem pierwszorzędowego wiązania estrowego i dzięki temu ulec dalszej hydrolizie pod wpływem lipazy. Proces izomeryzacji jest jednak powolny i dlatego też 2-monoglicerole są głównymi produktami końcowymi trawienia triacygliceroli.

Żółć to wydzielina produkowana w wątrobie odgrywająca istotną rolę w procesie trawienia. W skład żółci, oprócz wody, wchodzi: kwasy żółciowe, mucyna, barwniki żółciowe, cholesterol, kwasy tłuszczowe i sole nieorganiczne. Sole kwasów żółciowych są polarnymi pochodnymi cholesterolu. Dzięki obecności zarówno grup polarnych jak i niepolarnych są znakomitymi detergentami. Działają emulgująco na tłuszcze, dzięki czemu zwiększają dostępność cząsteczek lipidów na działanie lipazy. Sole kwasów żółciowych ułatwiają więc hydrolizę lipidów.

W przypadku szeregu schorzeń jak np. w przewlekłym zapaleniu trzustki i innych, dochodzi do niedoboru enzymów trawiennych. Istnieje szereg leków, zawierających skoncentrowane

wyciągi z trzustki zwierzęcej, lub zestaw oczyszczonych z różnych enzymów hydrolitycznych, które mają pomóc pacjentom w trawieniu i przyswajaniu pokarmów. Jednym z takich leków jest Kreon. Jedna kapsułka Kreonu zawiera (oprócz innych hydrolaz) lipazę o aktywności 10 000 U.



R – reszta dowolnego kwasu tłuszczowego

Cel ćwiczenia

Poznanie alkacymetrycznej metody oznaczania aktywności lipazy z użyciem oleju jako substratu oraz fenoloftaleiny jako wskaźnika. Ponadto zadaniem będzie porównanie aktywności lipazy działającej bez żółci i w obecności żółci.

Zasada metody:

Aktywność lipazy oznaczyć można przez zmiareczkowanie ilości uwolnionych kwasów tłuszczowych. Metodę tę można stosować do określenia aktywności lipazy w dowolnym preparacie enzymu (np. leku); pozwala ona również na zbadanie wpływu dodatkowych czynników (np. żółci) na aktywność lipazy. Aby oznaczyć aktywność enzymatyczną dowolnego enzymu należy określić szybkość początkową reakcji. W tym celu dokonuje się pomiaru przyrostu produktu (lub ubytku substratu) w zależności od czasu reakcji. Lipaza nie charakteryzuje się wysoką aktywnością molekularną i można na podstawie wstępnych doświadczeń tak dobrać ilość substratu i czas trwania reakcji, aby uprościć kolejne doświadczenia i prawidłowo wyznaczyć szybkość początkową reakcji w oparciu o jeden

punkt doświadczalny (jeden okres czasu inkubacji enzymu z substratem). Wstępne doświadczenia pozwoliły ustalić takie warunki, przy których możemy mieć pewność, że po upływie wybranego przez nas czasu inkubacji enzymu z substratem, szybkość reakcji jest wciąż równa szybkości początkowej czyli zależność przyrostu produktu od czasu jest wciąż prostoliniowa czyli enzym jest wciąż w pełni wysycony substratem.

Schemat doświadczenia:

1. Przygotowanie dwóch mieszanin reakcyjnych:

- enzym - preparat leku Kreon: bufor – 0.1 M bufor fosforanowy pH 7.4 (optimum działania lipazy przypada na pH 7.0-8.5); substrat –olej rzepakowy,
- enzym – preparat leku Kreon; czynnik wpływający na aktywność enzymatyczną – żółć;
substrat –olej rzepakowy.

2. Reakcja rozpoczyna się w momencie dodania do mieszaniny reakcyjnej ostatniego składnika. Reakcję prowadzimy przez 40 min. W łaźni wodnej (40⁰C) przy silnym wstrząsaniu. Reakcję zatrzymuje dodanie etanolu.

3. Oznaczanie ilości produktu w próbkach – oznaczanie ilości uwolnionych kwasów tłuszczowych przez miareczkowanie mianowanym roztworem NaOH.

Wykonanie:

Przygotować łaźnię wodną o temperaturze 40⁰C oraz 4 probówki typu Falcone i sporządzić w nich mieszaniny kontrolne z przygotowanego rozcieńczenia leku Kreon w 0.1 M buforze fosforanowym pH 7.4 (enzym w buforze).

W dwóch probówkach typu Falcone przygotować mieszaniny kontrolne:

I - 5 ml oleju oraz 5 ml buforu fosforanowego pH 7.4,

II - 5 ml oleju, 4 ml buforu fosforanowego pH 7.4 oraz 1 ml żółci.

W kolejnych dwóch probówkach typu Falcone przygotować mieszaniny reakcyjne:

Γ - 5 ml oleju 1 ml buforu fosforanowego pH 7.4, 4 ml preparatu enzymu,

IIΓ - 5 ml oleju, 1 ml żółci, 4 ml preparatu enzymu.

Następnie wstawić wszystkie probówki do łaźni wodnej i prowadzić reakcję przez 40 min. Przy jednoczesnym mieszaniu. Po zakończeniu inkubacji do każdej z kolb dodać po 8 ml etanolu, aby zatrzymać reakcję enzymatyczną.

Zawartość probówek przelać do kolbek o obj. 100 cm³, a następnie miareczkować w obecności fenoloftaleiny (10 kropli) używając mianowanego 0.05 M NaOH, aż do pojawienia się utrzymującego się wyraźnego różowego zabarwienia.

Opracowanie wyników:

1. Od średniej wartości uzyskanej w wyniku miareczkowania prób pełnych po 40 minutach inkubacji odjąć wartość próby kontrolnej (I' - I, II' - II) i różnicę w ml wodorotlenku sodowego podać prowadzącemu ćwiczenia.
2. Aktywność lipazy wyrazić w μ molach kwasów tłuszczowych uwolnionych w ciągu 1 min. przez 1 ml enzymu (1 ml 0,05-molowego wodorotlenku sodowego = 50 μ moli kwasu tłuszczowego). Należy pamiętać, iż w doświadczeniu użyto po 4 ml enzymu w każdej z prób pełnych a czas inkubacji trwał 40 minut.
3. Na podstawie uzyskanych wyników porównać aktywność lipazy działającej bez żółci i w obecności żółci.

Literatura:

- 1) Praktikum z biochemii. Praca zbiorowa pod red. A. Dubina i B. Turyny. Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 1999.
- 2) Przepisy do ćwiczeń z biochemii. Praca zbiorowa pod red. M. Stryjeckiej-Zimmer. Akademia Medyczna im. prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie, Lublin, 2004.
- 3) Ćwiczenia z biochemii. Praca zbiorowa pod red. L. Kłyszajko-Stefanowicz. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.
- 4) Podstawy biochemii. J. Kączkowski. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2005
- 5) Biochemia. Krótkie wykłady. Hames B.D. i Hooper N.M. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2002.
- 6) Materiały do ćwiczeń laboratoryjnych dla studentów Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (http://e.sggw.waw.pl/file.php/384/instrukcje/cw_4_e_rol.pdf)