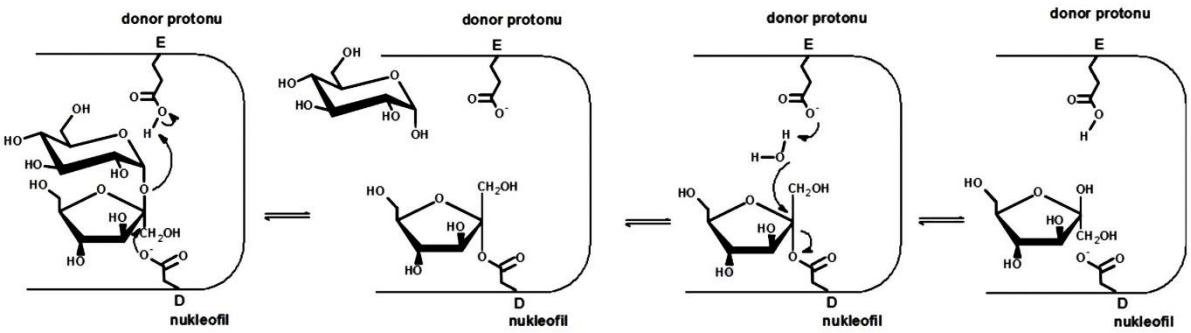
LABORATORIUM 5

WPŁYW JONÓW BIOMETALI NA AKTYWNOŚĆ ENZYMU

WPROWADZENIE LITERATUROWE

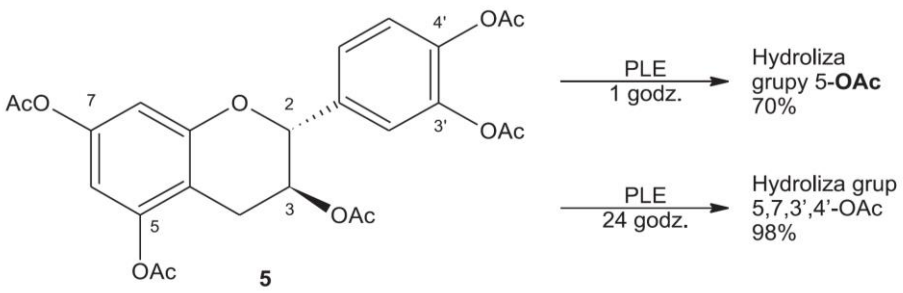
Chemia bionieorganiczna to nauka, której tematyka badawcza obejmuje obecne w organizmach **metaloproteiny** zawierające kompleksy metaloorganiczne lub klastery pełniąc przy tym funkcje transporterów substancji (np. hemoglobina, mioglobina). Białka zwane **enzymami** katalizują niezbędne reakcje biochemiczne, a niektóre ich centra aktywne posiadają np. aminokwasy, które bezpośrednio wiążą substrat [1]. Niektóre enzymy są aktywne tylko wtedy, gdy zawierają niebiałkowe cząsteczki (grupy funkcyjne) zwane **kofaktorami**. **Holoenzym** czyli katalitycznie aktywny enzym składa się z apoenzymu (część białkowa), koenzymu (część niebiałkowa) i grupy prostetycznej zwanej kofaktorem. Metaloenzymy stanowią przykład układów, w których właśnie jony metalu [np. Fe(II)/(III), Cu(I)/(II), Ni(I)/(II), Co(I)/(II)/(III)] pełnią funkcję kofaktora. Enzym bez kofaktora (**apoenzym**) jest zwykle nieaktywny chemicznie lub wykazuje znacznie obniżoną aktywność.

Enzym **inwertaza** występuje głównie w komórkach roślinnych, natomiast biorąc pod uwagę lokalizację komórkową można wyróżnić jego trzy izoformy: (1) inwertaza wakuolarna (Inv-V) – nierozpuszczalna w wodzie, (2) inwertaza ze ściany komórkowej (apoplast) (Inv-CW) oraz (3) inwertaza neutralna (cytoplazma) (Inv-N) [2]. Inwertaza pozyskiwana z drożdży wykazuje wysoką stabilność (praktycznie nie mierzalną utratę aktywności enzymu obserwuje się po upływie 5 tygodni przechowywania jego w temperaturze 4 °C). Optymalne pH aktywności rozpuszczalnej w wodzie Inv-CW zlokalizowanej w ścianie komórkowej wynosi około 3,5-5. Inwertaza ta wytwarzana jest przez pszczoły, hydrolizując sacharozę podczas powstawania miodu. W przemyśle cukrowniczym, w jednym z etapów produkcji soków (cukru) jest alkalizowanie surowego produktu, prowadzone w celu powstrzymania inwersji sacharozy i rozwoju drobnoustrojów w produkcie (przez zwiększenie pH produktu do około 11,0). **Inwertaza (INV)** (β-fruktofuranozydaza, β-fruktozydaza, sacharaza) katalizuje hydrolizę wiązania *O*-glikozydowego, prowadząc tym samym do rozpadu sacharozy na cząsteczki: D-glukozy i D-fruktozy. Proces hydrolizy sacharozy określa się zjawiskiem **inwersji** [3], a jej szczegółowy mechanizm został przedstawiony na **Rysunku 1**. Procesowi towarzyszy zmiana kierunku skręcania płaszczyzny polaryzacji z dodatniej na ujemną. Wzrost pH do ok. 10 powoduje całkowitą inaktywację tego enzymu.



Rysunek 1. Mechanizm katalityczny inwertazy [4,5].

Innym przykładem enzymu (hydrolaza) jest stabilna **esteraza** (**PLE**), która katalizuje reakcje wysoce chemo-, regio- i stereoselektywne (**Rysunek 2**) [6].



Rysunek 2. Regioselektywne działanie esterazy – hydroliza peracetylokatechiny [7].

Reakcje katalizowane przez PLE zachodzą, w większości przypadków, w temperaturze pokojowej lub lekko podwyższonej, w buforach wodnych, wodzie albo rozpuszczalnikach organicznych. Budowa centrum aktywnego tego enzymu umożliwia stosowanie szerokiej gamy różnych związków jako substratów, ponieważ enzym ten akceptuje różnorodne substraty.

LABORATORIUM 5: CEL BADAWCZY

- Poznanie wybranych metod izolowania enzymów z materiału roślinnego i/lub zwierzęcego.
- Projektowanie układów porównawczych (wzorcowych).
- Poszukiwanie wpływu wybranych soli biometali na aktywność enzymu.
- Kształtowanie umiejętności samodzielnego interpretowania wyników otrzymanych dla badanych układów w kontekście biomimetyki.

MATERIAŁ DO OPANOWANIA: Budowa, podział, rola i aktywność enzymów (biokatalizatorów); Metody izolowania i oczyszczania enzymów; Zagadnienia kinetyczne procesu katalizy enzymatycznej (inwersja sacharozy); Budowa, podział, rola i aktywność węglowodanów; Charakterystyka wiązania *O*-glikozydowego; Rola i wpływ jonów biometali na aktywność enzymów.

PLAN PRACY W LABORATORIUM: w oparciu o szczegółową instrukcję do **LABORATORIUM 5** przygotować spis szkła laboratoryjnego oraz odczynników niezbędnych do przeprowadzenia eksperymentów; wykonać wszystkie możliwe obliczenia (np. masy naważek lub objętości indywidualnych cieczy) niezbędne do praktycznego ich wykonania.

ZAPOZNANIE Z SUBSTANCJAMI: narysować wzory strukturalne i/lub przestrzenne wszystkich związków, o których mowa w instrukcji do **LABORATORIUM 5**, za wyjątkiem wzorów substancji prostych (nieorganicznych tj. HCl, NaOH, $CuSO_4$ itp.).

UWAGA: wszystkie notatki zawarte w dzienniku laboratoryjnym należy tak przygotować, aby na ich podstawie można było sporządzić sprawozdanie z przeprowadzonego eksperymentu.

LITERATURA

[1] R. M. Roat-Malone, *Chemia bionieorganiczna*, PWN, Warszawa, 1-477, 2010.

[2] B. Hawrylak, B. Wolska-Mitaszko, *Inwertazy roślinne – funkcja fizjologiczna, regulacja aktywności oraz wykorzystanie w biotechnologii, Biotechnologia,* **2:** 63-80, 2007.

[3] H. Kalinowska, S. Bielecki, *β-fruktofuranozydaza – właściwości, struktura, zastosowanie*, *Postępy biochemii*, **57:** 401-410, 2011.

[4] A. Reddy, F. Maley, *Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase. J. Biol. Chem.* **271**: 13953-13958, 1996.

[5] W. Lammens, K. Le Roy, A. Van Laere, A. Rabijns, W. Van den Ende, *Crystal structures of Arabidopsis thaliana cell-wall invertase mutants in complex with sucrose. J. Mol. Biol.* **377:** 378-385, 2008.

[6] P. Walser, P. Renold, V. N'Goka, F. Hosseinzadeh, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta*, **74:** 1941-1952, 1991.

[7] M. Mroczkiewicz, A. Fryszkowska, R. Ostaszewski, *Zastosowanie esterazy z wątroby świńskiej w syntezie organicznej, Biotechnologia,* **2:** 32-47, 2005.

[8] R. Jastrząb, M. T. Kaczmarek, M. Nowak, I. Pospieszna-Markiewicz, M. Skrobańska, M. Zabiszak „Ćwiczenia laboratoryjne z chemii bionieorganicznej", Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych Oddział Wielkopolski **na zlecenie Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu** Copyright by PZITS and UAM, Poznań 2015, str. 58-59.

INSTRUKCJE DO LABORATORIUM 5

WPŁYW JONÓW BIOMETALI NA AKTYWNOŚĆ ENZYMU

ĆWICZENIE 1. IZOLOWANIE ENZYMU Z MATERIAŁU ROŚLINNEGO LUB ZWIERZĘCEGO

Metoda I ***INWERTAZA (INV)***

Odważyć 5 g drożdży i rozetrzeć w moździerzu z dodatkiem piasku (4 g). Do roztartej próbki dodać około 100 ml wody i ponownie rozetrzeć powstałą mieszaninę niejednorodną. Po upływie 60 minut, próbkę należy odwirować. Po wirowaniu zlać do naczynia powstały supernatant z uwolnionym enzymem - inwertazą.

Metoda II ***INWERTAZA (INV)***

Odważyć 1,75 g drożdży i 1,5 g piasku do jednego naczynia, całość rozetrzeć dobrze bagietką szklaną i zalać 10 mL ogrzanej wcześniej do 28 st. C wody destylowanej. Mieszaninę postawić na mieszadle magnetycznym i mieszać przez 15 minut z użyciem dipola magnetycznego. Po tym czasie, próbkę dokładnie odwirować (15 minut, maks. obroty), a powstały w trakcie wirowania supernatant przenieść do 100 mL butelki z korkiem z 4-krotnie większą objętością acetonu (np. 3 mL supernatant + 12 mL acetonu) oziębionego wcześniej jest do temperatury ok. 4 - 8 st. C (lodówka). Wytrącony wskutek wytrząsania (20-30 s) osad odstawić na 30 minut, a po tym czasie układ odwirować i przenieść do probówki celem rozpuszczenia w 10 mL wody [8].

Metoda III ***INWERTAZA (INV)***

W moździerzu rozetrzeć 4 g drożdży z dodatkiem 8 g piasku. Próbkę rozcierać 5 minut, po czym dodać ok. 20 ml wody, całość ponownie dokładnie rozetrzeć. Odwirować (5000 obr/min, 10 min, w temp. 20 st. C). Zmierzyć objętość otrzymanego supernatantu cylindrem miarowym, po czym dodać 5-krotną objętość acetonu. Całość przelać do butelki z tworzywa sztucznego. Całą zawartość dokładnie wymieszać przez intensywne wytrząsanie (ok. 20 sekund). Wymieszaną zawartość butelki przelać do zlewki - poczekać do momentu wytrącenia się osadu (ok. 3 minuty). Próbkę odwirować (2000 obr/min, 2 min, w temp. 20 st. C). Otrzymany supernatant (aceton) zlać, a do próbek z osadem dodać po 3 ml wody destylowanej, po czym ponownie odwirować (5000 obr/min, 10 min, w temp. 20 st. C).

Metoda IV ***INWERTAZA (INV)***

10 g drożdży należy dobrze wymieszać z piaskiem (przez ok. 10-15 minut) w celu zniszczenia ściany komórkowej. Do próbki dodać 30 mL wody destylowanej oraz 0,5 mL toluenu. Próbkę inkubować ok. 2 godz. w temperaturze 37 st. C. Po tym czasie całość odwirować (4000 rpm, 20 minut). Supernatant będzie zawierał aktywną inwertazę, trwałą 3 do 4 dni pod warunkiem przechowywania w lodówce.

Metoda V ***ESTERAZA (PLE)***

Do zlewki o pojemności 150 mL należy odważyć 50 g wątróbki wieprzowej. Całą próbkę drobno pokroić i zmielić w młynku z dodatkiem 100 mL schłodzonego acetonu. Mielenie prowadzić przez 1 minutę. Zawiesinę przesączyć na lejku ze spiekiem, przesącz usunąć, a brązowy osad ponownie ponownie zmielić (250 obr/s) z dodatkiem 50 mL schłodzonego acetonu (1 min). Przesączyć, a otrzymany przesącz ponownie usunąć. Dodać 3 porcje schłodzonego acetonu (150 mL), całość ponownie zmielić. Próbkę przesączyć (przesącz usunąć), a otrzymany osad zważyć i zastosować jako źródło esterazy (PLE) w preparacie surowym [7].

ĆWICZENIE 2. TWORZENIE UKŁADU WZORCOWEGO

Opisać wodoodpornym markerem 6 probówek, w których umieścić 1 mL wodnego roztworu glukozy o odpowiednim stężeniu: 5%, 3%, 1%, 0,5%, 0,25% oraz po 1 mL wody [8]. Do każdej z probówek dodać 1 mL buforu o pH równym 4,0. Tak uzyskane układy termostatować w łaźni wodnej przez 15 minut (w temp. 30 °C). W międzyczasie przygotować drugą, odrębną łaźnię wodną (krystalizator z wrzącą wodą, na powierzchni której umieścić kulki zapobiegające parowaniu). Po upływie wskazanego czasu termostatowania 6 roztworów, próbki należy zalkalizować poprzez dodanie niewielkiej ilości stałego węglanu sodu (Na_2CO_3; soda oczyszczona) i dokładnie wymieszać. Sprawdzić papierkiem lakmusowym odczyn powstałej mieszaniny (pH powinno wynosić ok. 7-8), a następnie dodać do każdej 1 mL odczynnika Benedicta. Po wymieszaniu tak otrzymanych układów, wstawić probówki do przygotowanej łaźni z wrzącą wodą i ogrzewać je przez 4-5 minut. Zanotować w dzienniku własne obserwacje (zmiana barwy) i wnioski (np. równanie reakcji), próbki odstawić do statywu i traktować jako układy wzorcowe (porównawcze) niezbędne do kolejnych ćwiczeń.

UWAGA: łaźnie będą potrzebne do wykonania **ĆW. 3** oraz **4** – **nie rozmontowywać**!

ĆWICZENIE 3. OCENA AKTYWNOŚCI ENZYMU

W probówce (o objętości 10 mL) umieścić 1 mL wodnego roztworu enzymu (efekt **ĆW. 1**), 1 mL 5% wodnego roztworu sacharozy oraz 1 mL buforu o pH 4,0. Powstały roztwór dokładnie wymieszać i termostatować 15 minut w łaźni wodnej o temp. wody 30 °C. Po tym czasie, należy zastosować procedurę z **ĆW. 2**, próbkę zalkalizować poprzez dodanie niewielkiej ilości stałego węglanu sodu (Na_2CO_3; soda oczyszczona) i dokładnie wymieszać. Sprawdzić papierkiem lakmusowym odczyn powstałej mieszaniny (pH powinno wynosić ok. 7-8), a następnie dodać do niej 1 mL odczynnika Benedicta [8]. Po wymieszaniu tak otrzymanego układu, wstawić probówkę do łaźni z wrzącą wodą i ogrzewać ją przez 6-10 minut. Zanotować w dzienniku obserwacje własne (np. zmiana barwy) i wnioski (np. równanie reakcji) i porównać ostudzoną próbkę z wzorcami otrzymanymi w **ĆW. 2**.

ĆWICZENIE 4. DZIAŁANIE WYBRANYCH JONÓW BIOMETALI NA AKTYWNOŚĆ ENZYMU

Opisać wodoodpornym markerem 6 probówek, w których umieścić po 1 mL wodnego roztworu enzymu (efekt **ĆW. 1**), 1 mL 5% wodnego roztworu sacharozy oraz 1 mL buforu (pH 4,0). Próbki wymieszać i termostatować (30 st. C) przez 15 minut [8]. Po tym czasie, (nie wyjmując próbek z łaźni) dodać do każdej probówki 1 mL wodnego roztworu (0,5%) soli wybranych jonów biometali, czyli odpowiednio:
do 1-szej probówki - chlorek kadmu [$CdCl_2$],
do 2-giej probówki - chlorek magnezu [$MgCl_2$],
do 3-ciej probówki - chlorek cynku [$ZnCl_2$],
do 4-tej probówki - azotan(V) kadmu [$Cd(NO_3)_2$],
do 5-tej probówki - azotan(V) magnezu [$Mg(NO_3)_2$,
do 6-tej probówki - azotan(V) cynku [$Zn(NO_3)_2$].
Roztwory wymieszać i termostatować jeszcze 15 minut (30 °C). Po tym czasie, należy zastosować procedurę z **ĆW. 2**, wszystkie próbki zalkalizować poprzez dodanie do każdej niewielkiej ilości stałego węglanu sodu (Na_2CO_3; soda oczyszczona) i ponownie dokładnie wymieszać. Sprawdzić papierkiem lakmusowym odczyn powstałej mieszaniny (pH ok. 7-8), a następnie dodać do każdej z nich po 1 mL odczynnika Benedicta. Po wymieszaniu tak otrzymanych układów, wstawić próbki do łaźni z wrzącą wodą i ogrzewać je przez 6-10 minut. Po tym czasie próbki wystudzić w zimnej wodzie, a następnie porównać je z wzorcami otrzymanymi w **ĆW. 2**. Efekty doświadczenia, tj. obserwacje (np. zmiana barwy) i wnioski (np. równanie reakcji), zanotować w dzienniku laboratoryjnym.

RAPORT Z LABORATORIUM 5

GRUPA LABORATORYJNA: ……
PROWADZĄCY: ……
IMIĘ I NAZWISKO 1: ……
IMIĘ I NAZWISKO 2: ……
DATA: ……

1. **Wskaż istotne różnice** w sposobach izolowania enzymu – inwertazy (INV), tj. różnice w ***metodach I-IV*** opisanych w instrukcji do **LABORATORIUM 5.** Która z tych metod jest **Twoim zdaniem najbardziej wydajna**, to jest prowadzi do uzyskania największej ilości inwertazy? Podaj **krótkie uzasadnienie** swojego wyboru (**ĆW. 1**).
2. Na podstawie efektów obserwowanych w trakcie laboratorium, **wyjaśnij istotę** (znaczenie) tworzenia układów porównawczych (wzorcowych) tworzonych przez eksperymentatorów w laboratoriach chemicznych oraz **określ ich rolę** w badaniach naukowych (**ĆW. 2**).
3. **Wyjaśnij** na czym polega doświadczenie dowodzące o aktywności enzymu (**ĆW. 3**). **Uzasadnij** otrzymany kolor roztworu końcowego w tym ćwiczeniu, podając odpowiednie reakcje chemiczne.
4. W oparciu o przeprowadzone doświadczenia, **określ wpływ** jaki wywiera obecność jonów biometali na przebieg analizowanej na **LABORATORIUM 5** reakcji (**ĆW. 4**).