

POLITECHNIKA ŚLĄSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY

KATEDRA FIZYKOCHEMII I TECHNOLOGII
POLIMERÓW

LABORATORIUM Z FIZYKI
I BIOFIZYKI

Oznaczanie aktywności amylazy
ślinowej

13.1. Wprowadzenie

Enzymy to grupa białek działających w komórkach i płynach ustrojowych żywych organizmów jako biokatalizatory reakcji biosyntezy i rozkładu. W komórce enzymy występują pojedynczo lub tworzą układy wieloenzymatyczne katalizujące szereg następujących po sobie reakcji. Reakcje regulowane przez enzymy są podstawą wszystkich procesów życiowych: oddychania, wzrostu, skurczów mięśni, przewodzenia impulsów nerwowych, trawienia i wielu innych.

Większość enzymów składa się z części białkowej, czyli apoenzymu, oraz części niebiałkowej, czyli grupy prostetycznej lub koenzymu. Niebiałkowe części enzymu pełnią w reakcjach enzymatycznych funkcję przenośników elektronów określonych atomów lub ugrupowań chemicznych z jednego metabolitu na drugi. Część białkowa jest czynna tylko w połączeniu ze składnikiem niebiałkowym – koenzymem i decyduje o swoistości enzymu, a często i o rodzaju reakcji.

Enzymy charakteryzuje duża specyficzność, zarówno pod względem katalizowanej reakcji chemicznej jak i wyboru związków biorących w niej udział. Jeden enzym katalizuje na ogół pojedynczą reakcję chemiczną lub grupę ściśle pokrewnych reakcji.

Teoretycznie reakcje enzymatyczne są odwracalne, przy czym enzym nie ma wpływu na kierunek przebiegu reakcji. Przyspiesza on jedynie moment osiągnięcia stanu równowagi przez reakcję. Osiągnięcie punktu równowagi jest uwarunkowane prawami termodynamicznymi. Ponieważ w wyniku wielu reakcji przebiegających w jednym kierunku wydziela się energia należy dostarczyć równoważną ilość energii, aby spowodować zmianę kierunku ich przebiegu. Energia ta jest dostarczana w postaci wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych, jakimi są np. końcowe wiązania adenosynotryfosforanu (ATP).

13.1.1. Klasyfikacja enzymów

Międzynarodowa Unia Biochemii zaproponowała w 1964 roku podział enzymów na 6 klas w zależności od katalizowanej reakcji:

1. **oksydoreduktazy** (np. dehydrogenazy, oksydazy) - enzymy katalizujące reakcje, w których dochodzi do zmiany stopnia utlenienia.

- 2. transferazy** (np. aminotransferazy, acetylotransferazy, kinazy) – enzymy katalizujące reakcje przenoszenia grup funkcyjnych z jednej cząsteczki na drugą.
- 3. hydrolazy** (np. proteazy, celulaza, invertaza) - enzymy rozkładające substrat hydrolytycznie, z jednoczesnym przyłączeniem cząsteczki wody. np. wszystkie enzymy trawienne układu pokarmowego.
- 4. liazy** (np. dekarboksylazy aminokwasów) – enzymy katalizujące reakcje rozpadu bez udziału wody.
- 5. izomerazy** – enzymy katalizujące reakcje przegrupowań wewnątrzcząsteczkowych, czyli przebudowujące strukturę cząsteczki bez zmiany jej składu atomowego.
- 6. ligazy** (syntetazy) – enzymy katalizujące tworzenie nowych wiązań, czyli łączenie się dwóch cząsteczek (reakcje syntezy).

13.1.2. Mechanizm działania enzymów

Tworzenie lub zrywanie wiązań chemicznych w obecności enzymu poprzedzone jest powstaniem kompleksu enzym – substrat (ES). Substrat ulega związaniu w specyficznym rejonie enzymu, który nazywa się miejscem aktywnym. Miejsce aktywne enzymu to obszar, który wiąże substraty oraz dostarcza reszt aminokwasowych, biorących bezpośredni udział w tworzeniu i zrywaniu wiązań chemicznych. Po powstaniu produktów reakcji cząsteczka enzymu uwalnia się z kompleksu i po powrocie do formy pierwotnej tworzy nowy kompleks z następną cząsteczką substratu.

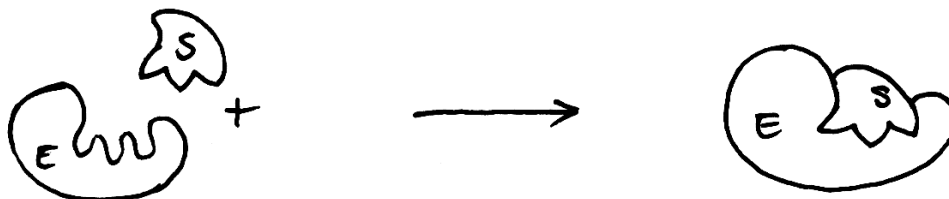
Wyróżnia się dwa typy mechanizmów łączenia się enzymu z substratem:

- model klucza i zamka – miejsce aktywne enzymu, musi być dopasowane swoim kształtem do substratu by móc przekształcić go w produkt (rys. 1)



Rys.1 Model klucza i zamka

- model indukowanego dopasowania - mechanizm opierający się na dopasowaniu kształtu enzymu do substratu lub odpowiedniej grupy substratów i przekształceniu ich w produkty. Enzym może również zniekształcać substrat wymuszając w nim konformację podobną do stanu przejściowego (rys. 2)



Rys. 2 Model indukowanego dopasowania

13.1.3. Właściwości kinetyczne enzymów

Leonor Michaelis i Maund Menten opisali zależność szybkości reakcji katalizowanej enzymem. Podstawową cechą tego modelu jest założenie, że kompleks enzym – substrat jest koniecznym etapem pośrednim procesu katalitycznego.

Najprostszy model, który odpowiada własnościom kinetycznym wielu enzymów można zapisać w postaci:



Enzym E łączy się z substratem S tworząc kompleks ES. Reakcję charakteryzuje stała szybkości k_1 . Istnieją dwie możliwe drogi rozpadu kompleksu ES. Może on dysocjować do E i S ze stałą szybkości k_2 lub może się przekształcać tworząc produkt P ze stałą szybkości k_3 . Zakłada się, że produkt reakcji nie może ulec powrotnemu przekształceniu w wyjściowy substrat.

Szybkość katalizy jest równa iloczynowi stężenia kompleksu ES i stałej k_3 :

$$V = k_3[ES] \quad (13.2)$$

Szybkości tworzenia i rozpadu ES wynoszą odpowiednio:

$$\text{szybkość tworzenia ES} = k_1 [E] [S] \quad (13.3)$$

$$\text{szybkość rozpadu ES} = (k_2 + k_3) [ES] \quad (13.4)$$

Jeżeli szybkość tworzenia kompleksu ES jest równa szybkości jego rozpadu to porównując równania (3) i (4) otrzymuje się:

$$[ES] = \frac{[E][S]k_1}{(k_2 + k_3)} \quad (13.5)$$

gdzie:

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (13.6)$$

nazywa się stałą Michaelisa. K_M jest równe takiemu stężeniu substratu, dla którego szybkość reakcji osiąga połowę swojej wartości maksymalnej.

W warunkach, kiedy stężenie enzymu jest dużo mniejsze od stężenia substratu, stężenie niezwiązanego enzymu $[E]$ jest równe całkowitemu stężeniu enzymu $[E_T]$ pomniejszonemu o stężenie kompleksu $[ES]$:

$$[E] = [E_T] - [ES] \quad (13.7)$$

Podstawiając równanie (7) do (5), a następnie do równania (2) otrzymuje się:

$$V = k_3[E_T] \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (13.8)$$

Maksymalną szybkość reakcji V_{\max} uzyskuje się wtedy, kiedy wszystkie miejsca enzymu są wysycane substratem, czyli kiedy $[S]/([S] + K_M)$ jest bliskie 1. Stąd:

$$V_{\max} = k_3[E_T] \quad (13.9)$$

W wyniku podstawienia równania (9) do równania (8) otrzymuje się równanie Michaelisa – Menten:

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (13.10)$$

13.1.4. Czynniki wpływające na aktywność enzymów

Enzymy są bardzo podatne na zmianę niektórych czynników zewnętrznych. Wpływa to na aktywność i szybkość zachodzących reakcji enzymatycznych

a) Temperatura

Enzymy tracą aktywność pod wpływem ciepła. Temperatura w granicach 50 – 60 °C powoduje szybką inaktywację większości enzymów. Inaktywacja ta jest nieodwracalna, ponieważ enzymy nie odzyskują aktywności po ochłodzeniu.

b) Odczyn

Dla większości enzymów wewnątrzkomórkowych optymalny jest odczyn zbliżony do obojętnego. Silne kwasy i zasady powodują nieodwracalną inaktywację tych enzymów.

c) Stężenie enzymu, substratu oraz kofaktorów

Przy stałym pH i stałej temperaturze oraz przy nadmiarze substratu szybkość reakcji jest wprost proporcjonalna do stężenia enzymu. Jeżeli układ wymaga obecności koenzymu to jego obecność określa szybkość reakcji.

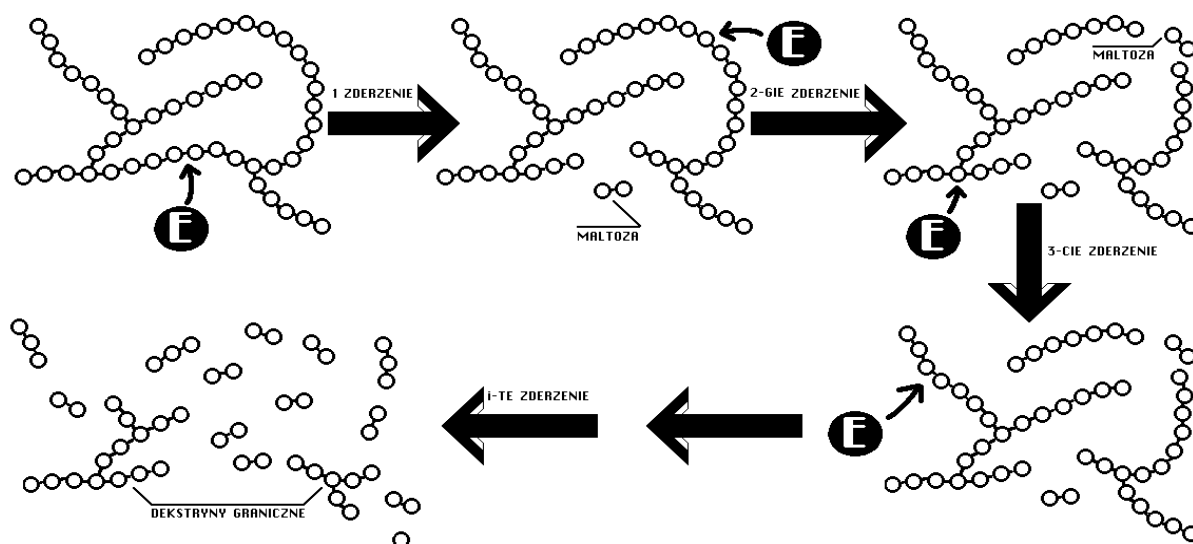
d) Trucizny enzymów

Niektóre enzymy są szczególnie wrażliwe na działanie trucizn, takich jak cyjanek, kwas jodooctowy, fluorek i in., przy czym substancje te powodują inaktywację enzymów. Same enzymy mogą także oddziaływać jak trucizny, jeżeli znajdują się w niewłaściwym miejscu.

13.1.5. Amylaza ślinowa

Amylaza ślinowa należy do grupy enzymów trawiennych zwanych hydrolazami. Enzymy te katalizują rozkład wiązań glikozydowych, łączących ze sobą cząsteczki cukrów prostych. Amylaza ślinowa rozkłada skrobię (wielocukier) na krótsze fragmenty z odłączeniem maltozy (dwucukru).

Aby zaszła reakcja, musi dojść do zderzenia efektywnego cząsteczki skrobi z enzymem. Amylaza ślinowa podczas zderzenia może “zaatakować” substrat w miejscu, w którym dokonuje się hydroliza enzymatyczna lub w miejscu nie podatnym na działanie enzymu. W wyniku aktywnego zderzenia enzymu z skrobią, amylaza ślinowa rozcinając substrat uwalnia maltozę, a powstałe produkty reakcji są traktowane jako substraty w następnych zderzeniach. W przypadku zderzenia nieefektywnego układ pozostaje bez zmian (rys. 3, zderzenie 3).



Rys. 3 Hydroliza skrobi

13.2. Pomiary

Celem ćwiczenia jest:

- stopniowy rozkład skrobi przez amylazę ślinową
- określenie optymalnej temperatury i pH dla amylazy ślinowej
- oznaczenie aktywności amylazy ślinowej metodą Wohlgemuta

13.2.1 Przygotowanie roztworu śliny

W celu przygotowania roztworu śliny należy usta przepłukać wodą destylowaną, chwilę poczekać i zebrać 2 cm³ śliny do probówki falcone. Zebraną ślinę należy rozcieńczyć 5 – krotnie wodą destylowaną.

13.2.2 Hydroliza skrobi

Odczynniki:

- roztwór śliny
- 1% roztwór skrobi: odważyć 1 g skrobi i przygotować zawiesinę w ok. 10 ml wody, odmierzyć 90 ml wody i zagotować. Do wrzącej wody wlać zawiesinę skrobiową, zagotować i szybko schłodzić otrzymany 1 % kleik skrobiowy.
- 0,0025% roztwór jodu

Przed przeprowadzeniem rozkładu skrobi, należy przygotować statyw z 15 probówkami szklanymi wypełnionymi 1 cm^3 roztworu jodu.

W probówce falcone wymieszać 1 cm^3 roztworu śliny z 9 cm^3 wody destylowanej. Probówkę umieścić w łaźni wodnej o temperaturze $37\text{ }^\circ\text{C}$. Po osiągnięciu przez roztwór zadanej temperatury (około 5 min), wlać do niego 10 cm^3 1% roztworu skrobi inkubowanego w tej samej temperaturze. Po zmieszaniu składników pobrać pipetą 1 cm^3 mieszaniny i dodać do pierwszej próbki z jodem. Następnie mieszaninę reakcyjną (skrobia + ślina) należy inkubować w temperaturze $37\text{ }^\circ\text{C}$. Co 30 sekund pobierać po 1 cm^3 hydrolizatu i dodawać do kolejnej próbki z jodem. Jeśli barwa w trzech pierwszych probówkach nie wykazuje wyraźnej zmiany, hydrolizat pobierać, co minutę.

13.2.3 Wpływ temperatury na aktywność amylazy

Odczynniki:

- 1) roztwór śliny
- 2) 1% roztwór skrobi (o temperaturze 20°C , 37°C , 45°C)
- 3) 0,0025% roztwór jodu

Przed przeprowadzeniem ćwiczenia należy przygotować statyw z 15 probówkami szklanymi wypełnionymi 1 cm^3 roztworu jodu.

W trzech probówkach falcone wymieszać 1 cm^3 roztworu śliny z 9 cm^3 wody destylowanej. Probówki inkubować w trzech różnych temperaturach, a następnie dodać do nich po 10 cm^3 roztworu skrobi o tej samej temperaturze. Włączyć stoper. Pobierać, co 1 minutę 1 cm^3 hydrolizatu z mieszanin o różnych temperaturach i dodawać je do kolejnych probówek z jodem. W przypadku braku widocznej zmiany lub zbyt szybkiej zmiany barwy skorygować odstęp czasu, w którym pobierany jest hydrolizat

13.2.4 Wpływ pH na aktywność amylazy

Odczynniki:

- 1) roztwór śliny
- 2) 1% roztwór skrobi
- 3) 0,0025% roztwór jodu
- 4) bufor cytrynianowy – fosforanowy o pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5

Przed przeprowadzeniem ćwiczenia należy przygotować statyw z 15 probówkami szklanymi wypełnionymi 1 cm^3 roztworu jodu.

W trzech probówkach falcone wymieszać 1 cm^3 roztworu śliny z 9 cm^3 buforu o trzech różnych wartościach pH, wskazanych przez prowadzącego ćwiczenie. Probówki inkubować w temperaturze 37°C , a następnie dodać do nich po 10 cm^3 roztworu skrobi o tej samej temperaturze. Włączyć stoper. Pobierać, co 2 minuty 1 cm^3 hydrolizatu z mieszanin o różnych pH i dodawać je do kolejnych probówek z jodem. W przypadku braku widocznej zmiany lub zbyt szybkiej zmiany barwy skorygować odstęp czasu, w którym pobierany jest hydrolizat

13.2.5 Wyznaczanie aktywności amylazy ślinowej metodą Wohlgemuta

Odczynniki:

- 1) roztwór śliny: usta przepłukać wodą destylowaną, chwilę poczekać i zebrać 2 cm^3 śliny do probówki falcone. Zebraną ślinę należy rozcieńczyć 5 – krotnie buforem o odpowiednim pH
- 2) 1% roztwór skrobi
- 3) 0.25% roztwór jodu
- 4) bufor cytrynianowo - fosforanowy o pH wyznaczonym w punkcie 13.2.4

W statywie przygotować 10 probówek i oznakować je numerami od 1 do 10. Do pierwszej probówki dodać 4 cm^3 przygotowanego roztworu śliny. Do pozostałych dziewięciu probówek dodać po 2 cm^3 buforu. Następnie, przygotować serię rozcieńczeń roztworu śliny pobierając z pierwszej probówki 2 cm^3 roztworu i przenosząc go do probówki drugiej, z której, po dokładnym, (ale delikatnym!) wymieszaniu, pobrać 2 cm^3 roztworu i przenieść do kolejnej probówki. Procedurę powtórzyć do dziesiątej probówki, z której pobrane 2 cm^3 roztworu wylewa się.

Probówki inkubować w temperaturze wyznaczonej w punkcie 13.2.3 a następnie dodać do każdej z nich po 2 cm^3 1% roztworu skrobi, wymieszać i pozostawić w tej samej temperaturze na 30 minut. Po tym czasie do każdej probówki dodać po kropli 0.25% roztworu jodu i obserwować zmianę barwy.

13.3 Wyniki, obliczenia i niepewność pomiaru

1. Na podstawie pomiarów (punkt 13.2.2) wyznaczyć czas rozkładu skrobi przez amylazę ślinową. Dane umieścić w tabeli:

Nr. próbówki	Czas inkubacji	Obserwacje
1		
2		
3		
...		
n		

2. Zgodnie z punktem 13.2.3 określić optymalną temperaturę dla reakcji rozkładu skrobi przez amylazę ślinową. Wyniki umieścić w tabeli:

Temperatura	Nr. próbówki	Czas inkubacji	Obserwacje
20°C	1		
	2		
	3		
	...		
	n		
37°C	1		
	2		
	3		
	...		
	n		
45°C	1		
	2		
	3		
	...		
	n		

3. Na podstawie pomiarów (punkt 13.2.4) określić wpływ pH na aktywność amylazy ślinowej. Dane zapisać w tabeli:

pH	Nr. próbówki	Czas inkubacji	Obserwacje
pH1	1		
	2		
	3		
	...		
	n		
pH2	1		
	2		
	3		
	...		
	n		
pH3	1		
	2		
	3		
	...		
	n		

4. Pomiar z punktu 13.2.5 umieścić w tabeli:

Nr. próbówki	pH	Temperatura	V_{śliny} [cm³]	Czas inkubacji	Obserwacje
1					
2					
3					
...					
10					

Na podstawie wyników z tabeli obliczyć aktywność amylazy ślinowej, ze wzoru:

$$Aktywnosc = \frac{c \cdot V}{b \cdot t} \quad (13.11)$$

gdzie:

c – stężenie skrobi [$\mu\text{mol/ml}$] $M_{\text{skrobi}} = 15\,000$ [g/mol]

V – objętość mieszaniny reakcyjnej [cm^3]

b – ilość śliny w mieszaninie reakcyjnej [mg] $\rho_{\text{śliny}} = 1,01$ [g/cm^3]

t – czas inkubacji [min]

Jednostką aktywności enzymatycznej jest [U]. Jeden U to ilość enzymu katalizująca przemianę 1 μmola substratu w czasie 1 minuty.

5. Przeprowadzić analizę błędów wyznaczania aktywności metodą obliczenia niepewności danej poniższym wzorem:

$$dA = \sqrt{\left|\frac{\partial A}{\partial c}\right|^2 dc^2 + \left|\frac{\partial A}{\partial V}\right|^2 dV^2 + \left|\frac{\partial A}{\partial b}\right|^2 db^2 + \left|\frac{\partial A}{\partial t}\right|^2 dt^2} \quad (13.12)$$

Końcowy wynik należy podać w postaci:

$$A = A \pm dA \quad (13.13)$$

13.4 Pytania

1. Budowa enzymu i jego działanie.
2. Omów budowę centrum aktywnego enzymu. Podaj definicję 1 Katala. Na czym polega działanie inhibitora współzawodniczącego oraz efektora allosterycznego na enzym.
3. Klasyfikacja enzymów.
4. Własności kinetyczne enzymów.
5. Co to jest stała K_m . Narysować wykres, o czym on świadczy? Czym jest standardowa jednostka aktywności?

6. Czynniki wpływające na aktywność enzymów.
7. Omów hydrolazy.
8. Opisz amylazę ślinową.
9. Omów reakcję hydrolizy skrobi
10. Zastosowanie enzymów

12.5. Literatura

1. Villee C. A., *Biologia*, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 1990.
2. Berg J. M., Stryer L., Tymoczko J. L., *Biochemia*, PWN, Warszawa, 2007.
3. Hames D. B., Hooper N. M., *Biochemia. Krótkie wykłady*, PWN, Warszawa, 2007.
4. Niewiarowski S., *Enzymy w biologii i medycynie*, PZWL, Warszawa, 1965.
5. Kączkowski J., *Podstawy biochemii*, WNT, Warszawa, 2009.
6. Lachowicz L., Turska E., *Biochemia jamy ustnej*, PZWL, Warszawa, 2008.
- 7.