# Hydrolazy- peptydazy (pepsyna, trypsyna)

# Cel ćwiczeń:

- Ocena wpływu pH środowiska na aktywność pepsyny
- Ocena aktywności trypsyny na podstawie ilości strawionego białka mierzonego metodą biuretową

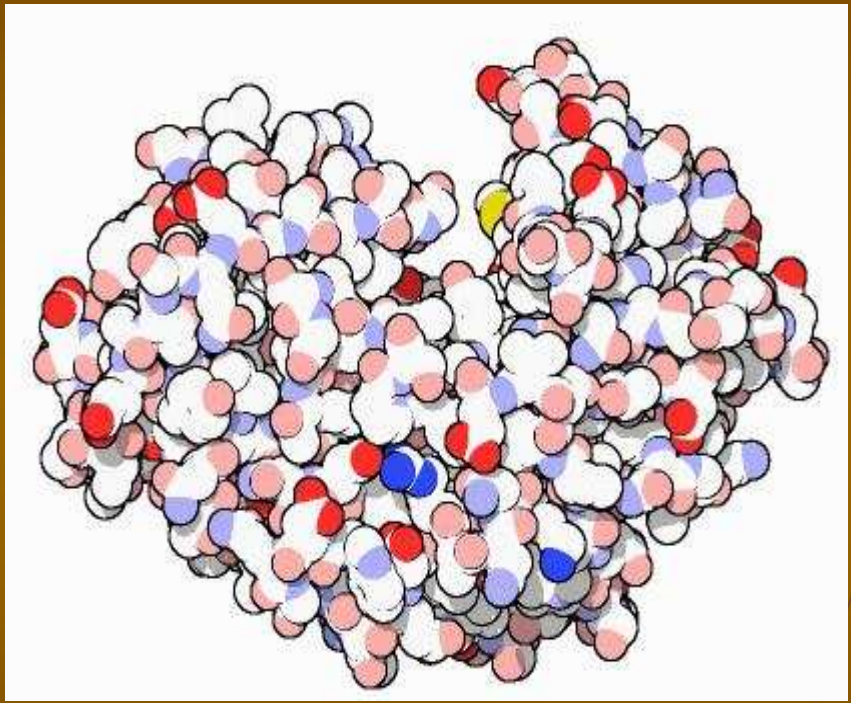
# E.C.3.3.4.4.1 Pepsyna

# Występowanie:

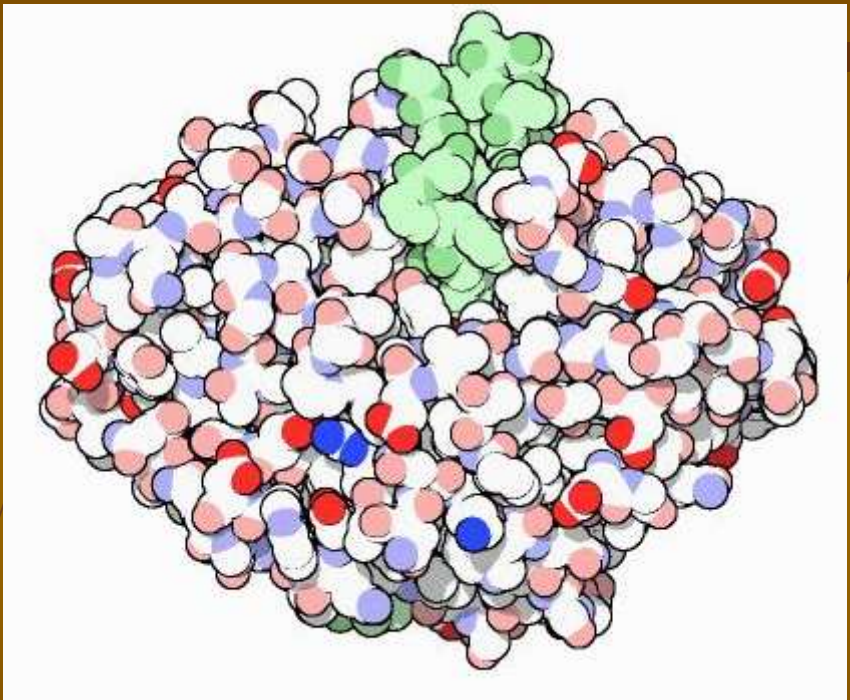
- Proteaza soku żołądkowego
- Produkowana przez komórki główne błony śluzowej żołądka
- Postać nieaktywna (preenzym)- Pepsynogen

# Aktywacja:

- Proces spontaniczny przy pH poniżej 5 w trzech etapach
- Kwaśne środowisko żołądka zapewnia obecność HCl
- Odcięcie łańcucha 44 aminokwasów powoduje odsłonięcie kwasu glutaminowego znajdującego się w centrum aktywnym enzymu
- Optimum pH 1-2



PEPSYNA



PEPSYNOGEN

# Działanie:

- Hydrolaza peptydylo-peptydów rozkładająca wiązania peptydowe białek za wyjątkiem keratyn i protamin
- Preferuje wiązania utworzone pomiędzy fenyloalaniną i tyrozyną z innymi aminokwasami oraz leucyną i kwasem glutaminowym

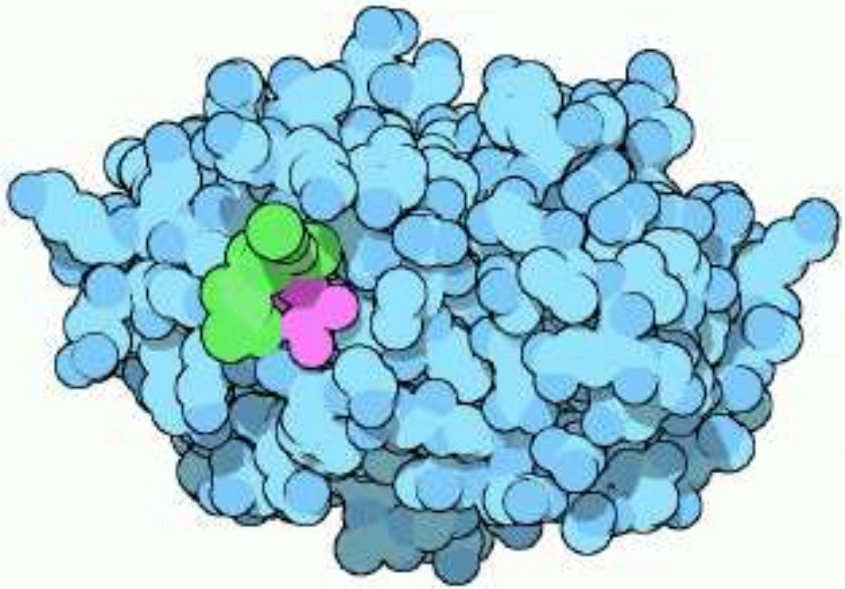
# E.C.3.4.4.4. Trypsyna

# Występowanie:

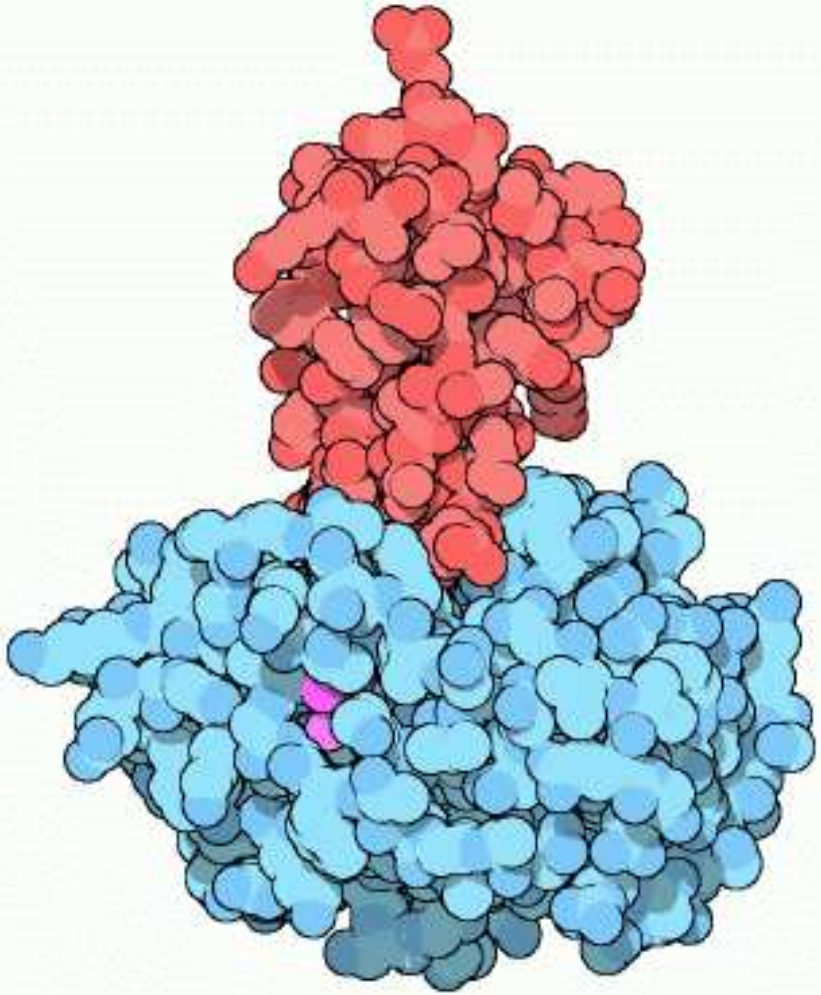
- Proteaza soku trzustkowego
- Produkowana przez komórki trzustki w formie nieaktywnej- trypsynogenu

# Aktywacja:

- Niezbędny jest udział enterokinazy- enzym produkowany przez błonę śluzową dwunastnicy
- Jest to proces autokatalityczny
- Odcinany jest fragment 6-ciu aminokwasów powodując odsłonięcie w centrum aktywnym układu Gli- Asp- Ser-Gli
- Optimum pH 7-9



TRYPSYNA



TRYPSYNOGEN

# Działanie:

- Hydrolaza peptydylo-peptydów katalizująca rozpad wiązania peptydowego utworzonego przez lizynę i argininę z innymi aminokwasami

# E.C.3.4.4.4. Chymotrypsyna

- Działanie nie jest do końca poznane, prawdopodobnie rozkłada wiązania utworzone przez aminokwasy aromatyczne

# Hormony:

- W trawieniu białek niezbędny jest udział:

- ✓ Gastryny pobudzającej sekrecję HCl
- ✓ Sekretyny pobudzającej wydzielanie soku trzustkowego, w którym zapewnia obecność odpowiedniej ilości wody i jonów $HCO_3^-$
- ✓ Pankreozyminy wpływającej na wydzielanie soku trzustkowego oraz perystaltykę przewodu pokarmowego

# Wchłanianie aminokwasów:

- Niezbędna jest obecność PLP oraz jonów Mn
- Najszybciej wchłaniana jest cysteina, natomiast najwolniej wchłaniany jest kwas glutaminowy i kwas asparaginowy

# Zadanie 1

**Badanie aktywności pepsyny w różnych warunkach pH**

**Wykonanie.** Do probówek oznaczonych 1, 2, 3, 4 odmierzyć po 2 cm3 pepsyny. Probówkę nr 4 ogrzać nad palnikiem (inaktywacja pepsyny). Do pozostałych probówek dodać:

- 1 - 2 $cm^3$ 0,2 $mol/dm^3$ HCl
- 2 - 2 $cm^3$ 1 $mol/dm^3$ $CH_3$ COOH
- 3 - 2 $cm^3$ buforu o pH 7,2

Następnie do wszystkich 4 probówek dodać niewielką porcję białka. Próby wstawić do łaźni wodnej o temp. 37°C. Po godzinnej inkubacji obejrzeć próby. Podać nr probówki, w której białko uległo strawieniu?

# Zadanie 2

**Badanie aktywności trypsyny**

**Wykonanie.** Do 3 probówek wirówkowych oznaczonych 1, 2, 3 odmierzyć po 1 $cm^3$ 30% TCA. W oddzielnej probówce „A” przygotować układ inkubacyjny składający się z 4 $cm^3$ 1% kazeiny w 0,1 mol/dm3 NaHCO3 oraz 1 cm3 trypsyny. Zawartość zmieszać. Po tej czynności natychmiast pobrać 1 cm3 tej mieszaniny do probówki wirówkowej oznaczonej nr 0.

Pozostałość mieszaniny w probówce „A” inkubować przez 10 min. w temp. 37°C. Po 10 min. pobrać po 1 $cm^3$ tej mieszaniny do probówek wirówkowych nr 1 i 2. Próby 0, 1, 2 odstawić na 10 min. a następnie wirować 15 min. z użyciem siły 2 000 x g. Po wirowaniu supernatant wylać.

Do osadu dodać 1 $cm^3$ 1 mol/$dm^3$ NaOH, a po rozpuszczeniu się osadu, dodać 4 $cm^3$ odczynnika miedziowego. Zmieszać zawartość i pozostawić w temp. pokojowej na około 20 min.

W tym czasie przygotować próbę „ślepą” (odczynnikową) – 4 $cm^3$ odczynnika miedziowego i 1 $cm^3$ wody dest. Odczytać absorbancję prób 0, 1, 2 przy długości fali 540 nm wobec próby „ślepej”. Zawartość białka w badanym roztworze odczytać z krzywej wzorcowej.