UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w Lublinie | WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

Otrzymywanie inwertazy – β-fruktofuranozydazy (EC 3.2.1.26) z drożdży i badanie jej właściwości

Wprowadzenie

Inwertazy (β-fruktofuranozydazy, EC 3.2.1.26) występują u bakterii, grzybów, roślin i zwierząt. Rozkładają sacharozę na heksozy - glukozę i fruktozę. Sacharoza, dwucukier nie posiadający właściwości redukujących, jest jednym z materiałów zapasowych roślin i główną formą transportową węglowodanów w roślinach. Jej rozkład dostarcza roślinom monocukrów, które są substratami glikolizy i biorą udział w regulacji procesów komórkowych.

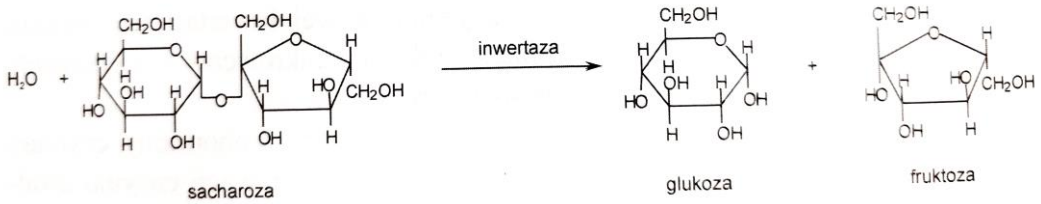
Sacharoza i heksozy mogą działać jako cząsteczki sygnałowe, wpływając na ekspresję genów i rozwój roślin, a także są zaangażowane w procesy obronne. Roślinne izoformy inwertazy różnią się lokalizacją subkomórkową, optimum pH i punktem izoelektrycznym (pI) – czyli takim pH, w którym cząsteczka białka enzymatycznego występuje w postaci jonu obojnaczego. Inwertazy obojętne lub zasadowe znajdują się w cytoplazmie i niewiele wiadomo o ich funkcjach. Uważa się, że pełnią one rolę w katabolizmie sacharozy. Inwertazy kwaśne znajdują się w wakuolach i przypuszcza się, że regulują zakres stężeń sacharozy akumulującej się w czasie fotosyntezy i eksportowanej do innych części roślin. Najlepiej poznanymi izoformami są nierozpuszczalne kwaśne inwertazy ulokowane w przestrzeni apoplastycznej, czyli związane ze ścianą komórkową. Są one modyfikowane prze N-glikozylację, a ich wypadkowy ładunek dodatni umożliwia wiązanie z ujemnie naładowanymi składnikami ściany komórkowej. Inwertazy te pośrednio lub bezpośrednio przyczyniają się do zmiany proporcji cukrowców w komórkach, przez co grają główną rolę w regulacji procesów rozwojowych. Inwertazy apoplastyczne stymulowane są przez: cukry, fitohormony, czynniki stresowe (biotyczne i abiotyczne). W dodatku, w wyniku aktywacji enzymu uwalniane heksozy są cząsteczkami sygnalnymi do akumulacji fitohormonów, ekspresji genów zaangażowanych w mechanizmy obronne i do indukcji zwrotnej inwertazy. U *Arabidopsis* sześć genów koduje inwertazy związane ze ścianą komórkową, a geny te wykazują specyficzną i zróżnicowaną ekspresję w różnych częściach rozwijającej się rośliny. Ekspresja czterech z nich jest silniejsza w czasie podziałów komórkowych. Od aktywności inwertazy zależą zatem wzrost i podziały mitotyczne. Aktywność inwertazy związanej ze ścianą komórkową jest hamowana i tym sposobem regulowana przez specyficzne białka regulatorowe.

Inwertazy wydają się być szczególnie ważnymi enzymami również dla zwierząt, są obecne bowiem u owadów. U pszczół występują w ślinie, gdzie biorą udział w przetwarzaniu cukru z nektaru kwiatowego do cukrów prostych. Mrówki, żywiące się zarówno pokarmem zwierzęcym, jak i roślinnym, mogą metabolizować związki pochodzące z wielu różnych źródeł pożywienia. Badania wykazały, że międzygatunkowe różnice w aktywności enzymów trawiennych mogą odzwierciedlać nawyki żywieniowe mrówek. Wiele mrówek żywi się bogatymi w węglowodany płynnymi źródłami pokarmu, takimi jak spadź, sok roślinny i nektar pozakwiatowy (tj. nektar wydzielany na narządach wegetatywnych, który nie jest funkcjonalnie zaangażowany w zapylanie. Ponieważ sacharoza jest powszechna we wszystkich tych źródłach pożywienia, aktywność inwertazy jest wymagana do wykorzystania jej z pokarmu.

Inwertazy są wykorzystywane w przemyśle spożywczym do produkcji czekoladek z półpłynnym nadzieniem. Podczas produkcji nadzienie, którego głównym składnikiem jest sacharoza występuje w postaci stałej i jest pokrywane warstwą czekolady. Następnie takie pralinki dojrzewają przez kilka tygodni, w trakcie których w wyniku działania inwertazy dodanej w procesie produkcji, sacharoza rozkładana jest do fruktozy i glukozy, które chłonąc wilgoć ze środowiska powodują w efekcie upłynnienie nadzienia.

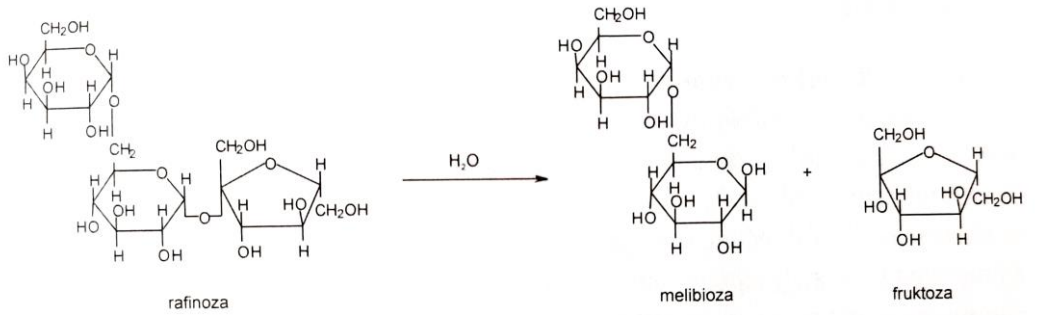
Inwertazy występujące w organizmach grzybów są dobrze poznane, np. enzymy z *S. cerevisiae*, czy *Aspergillus*. Te ostatnie mają zdolność syntezy fruktooligosacharydów i są wykorzystywane w produkcji tych cukrowców na skalę techniczną. Chociaż właściwości inwertaz z grzybów nie różnią się zasadniczo od enzymów roślinnych, to ich sekwencje DNA wskazują na osobną ewolucję. W komórkach drożdży inwertaza występuje w dwóch formach: zewnątrzkomórkowej, związanej ze ścianą komórkową (występującej w większości) i wewnątrzkomórkowej. Obydwie formy enzymu są transkrybowane z tego samego genu, a ich translacja rozpoczyna się od dwóch różnych kodonów start. Powoduje to, że inwertaza zewnętrzna na końcu aminowym ma dwa dodatkowe aminokwasy. Inwertaza wewnętrzna pozostaje w cytozolu, zewnętrzna wchodzi do retikulum endoplazmatycznego dzięki sekwencji sygnałowej. W trakcie sekrecji i transportu do przestrzeni periplazmatycznej do enzymu przyłączane są oligosacharydy mannozowe (proces glikozylacji), które mogą stanowić aż 50% masy cząsteczkowej enzymu.

Inwertaza z drożdży hydrolizuje głównie sacharozę (rys. 1), w mniejszym zaś stopniu inulinę i rafinozę (rys. 2). Mechanizm hydrolizy sacharozy opiera się o katalizę nukleofilową (Asp-23) i kwasowo-zasadową (Glu-204). Zgodnie z tym mechanizmem podstawienie asparaginy (Asn) w miejsce asparaginianu w pozycji 23 (Asp-23) powoduje, że enzym staje się całkowicie nieaktywny. Natomiast zastąpienie glutaminianu w pozycji 204 (Glu-204) alaniną (Ala) daje 3000-krotnie mniejszą aktywność enzymu.

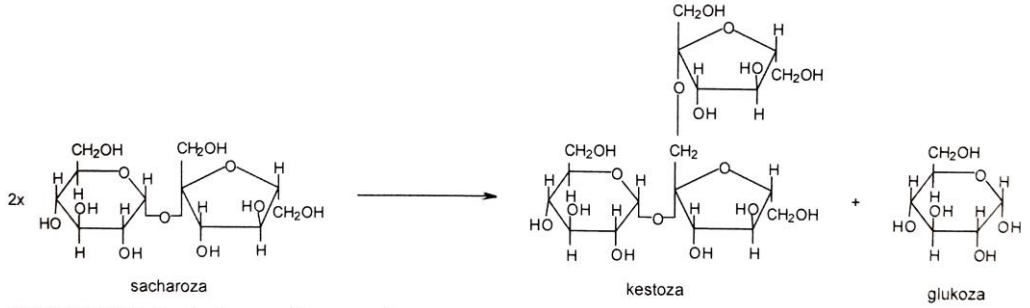


RYSUNEK 1. Reakcja hydrolizy sacharozy katalizowana przez inwertazę

Inwertazy katalizują też hydrolizę innych oligosacharydów (trehalozy, laktozy, rafinozy), ale z 10-krotnie mniejszą szybkością reakcji. W wysokich stężeniach substratu inwertaza wykazuje aktywność transferazową typu sacharoza: sacharoza, polegającą na przeniesieniu reszty fruktozylowej z jednej cząsteczki sacharozy na drugą. W rezultacie powstaje glukoza i trisacharyd – fruktozylosacharoza (kestoza), która jest również hydrolizowana przez inwertazę (rys. 3).

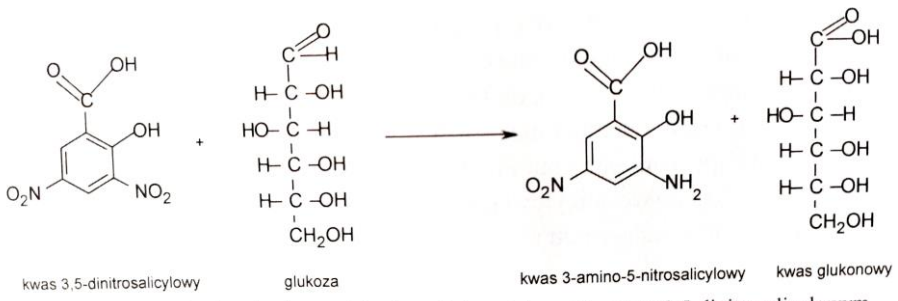


RYSUNEK 2. Reakcja hydrolizy rafinozy katalizowana przez inwertazę



RYSUNEK 3. Reakcja transferazowa inwertazy

Badanie aktywności β-fruktofuranozydazy oparte jest na działaniu enzymu na sacharozę i oznaczaniu ilości powstających cukrów prostych – glukozy i fruktozy w określonych warunkach temperatury, pH, czasu trwania reakcji. Reakcję rozpoczyna się dodaniem enzymu lub substratu, a przerywa dodaniem 1% roztworu kwasu 3,5-dinitrosalicylowego. W trakcie ogrzewania zachodzi reakcja red-oks między cukrami redukującymi i grupą nitrową w pozycji 3 kwasu DNS (rys. 4). Po odpowiednim rozcieńczeniu wodą, absorbancję mierzy się przy długości fali 540 nm, a ilość powstałych heksoz określa z krzywej wzorcowej.



RYSUNEK 4. Reakcja oksydacyjno-redukcyjna między glukozą i kwasem 3,5-dinitrosalicylowym

Literatura

1. Praktikum z enzymologii / pod red. Jolanty M. Dzik, Wydawnictwo: SGGW, 2013.
2. Journal of Chemical Ecology, Vol. 31, No. 2, February 2005. DOI: 10.1007/s10886-005-1352-y
3. https://www.uniprot.org/uniprotkb/P10594/entry#subcellular_location

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w Lublinie

Część doświadczalna

Cel ćwiczenia: Wyizolowanie inwertazy z drożdży i zbadanie jej aktywności, termostabilności oraz określenie optimum pH dla działania enzymu.

Odczynniki i materiały:
1. Drożdże piekarskie (świeże).
2. Pył szklany/piasek.
3. 0,2 M roztwór sacharozy w 0,04 M buforze octanowym o pH 4,7.
4. Uniwersalny bufor Brittona i Robinsona.
5. 0,4 M roztwór sacharozy w wodzie (do badania wpływu pH).
6. 1% kwas 3,5-dinitrosalicylowy (DNS) z 0,4 M NaOH i 1 M winianem sodowo-potasowym.
7. Wzorzec glukozy-fruktozy.
8. Aceton schłodzony.
9. Moździerz.
10. Wirówka z rotorem na 15 ml probówki (11467) i 125 ml butelki (12436a).
11. Łaźnie wodne (nagrzana do 30°C, 40°C, 50°C i 60°C oraz wrząca łaźnia wodna).
12. Spektrofotometr.
13. Lód do schłodzenia probówek.

Wykonanie:

Ekstrakcja inwertazy:

Naważkę 1,2 g drożdży piekarskich dokładnie rozetrzeć w moździerzu z 1,2 g pyłu szklanego. Dodać 2,5 ml wody destylowanej i rozcierać dalej do otrzymania homogennej konsystencji. Dodać jeszcze 2,5 ml wody i po wymieszaniu przelać homogenat do probówki wirówkowej na 15 ml. Moździerz przepłukać dodatkowo 2,5 ml wody destylowanej i połączyć wodę z homogenatem znajdującym się w probówce. Probówki wirówkowe zrównoważyć parami i wirować przez 20 min (12 000 x g; rotor 11467). Po odwirowaniu znajdujący się nad osadem supernatant ostrożnie przelać do cylinderka i zmierzyć objętość. Przenieść preparat do butelki wirówkowej na 125 ml i dać 5-krotną objętość zimnego acetonu. Aceton należy dodawać powoli, mieszając zawartość probówki. Po 15 min odwirować wytrącone białka (4500 x g; rotor uchylny 12436a). Supernatant ostrożnie przelać do pojemnika na odpady organiczne, a osad rozpuścić w 5 ml wody destylowanej.

Oznaczanie aktywności enzymu:

Ważne! W celu oznaczenia aktywności enzymu należy odpowiednio rozcieńczyć preparat inwertazy. Enzym o zbyt dużej aktywności nie da wiarygodnych wyników pomiaru szybkości reakcji, ponieważ zachodzi ryzyko zbyt dużego zużycia substratu i zbyt dużych wartości absorbancji. W rezultacie oznaczona aktywność enzymu byłaby obarczona dużym błędem.

Do 3 probówek (w tym jedna kontrolna) odmierzyć po 1 ml 0,2 M sacharozy w buforze octanowym (pH 4,7) i preinkubować 5 min w łaźni wodnej (30°C). Roztwór enzymu również ogrzać w 30°C. Po tym czasie do dwóch probówek badanych w odstępie 30 sek dodać po 1 ml roztworu enzymu. Po 10 min inkubacji do wszystkich probówek dodać po 2 ml kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS), a do probówki kontrolnej 1 ml roztworu enzymu. Wszystkie probówki wstawić do wrzącej łaźni wodnej i ogrzewać przez 10 min. Następnie schłodzić próby, do każdej dodać po 5 ml wody destylowanej i intensywnie wymieszać. Zmierzyć absorbancję prób przy 540 nm, zerując aparat na próbę kontrolą. Jeśli odczyty absorbancji będą wynosić 0,3-0,6, można wykonywać dalsze oznaczenia. Jeśli będą za małe lub za duże,

trzeba przygotować nowe rozcieńczenie enzymu.

Badanie termostabilności enzymu:

Żeby przekonać się, czy białko jest termostabilne, trzeba sprawdzić w jakich granicach temperatury aktywność enzymu nie ulega zmianie. W tym celu do 5 probówek odpipetować po 1 ml roztworu enzymu i dwie z nich umieścić w łaźni o temperaturze 30°C (jedna będzie próbą kontrolną), trzecią w 40°C, czwartą w 50°C, piątą w 60°C i pozostawić w tych temperaturach na 30 min. Następnie probówki ochłodzić w lodzie i przystąpić do pomiaru aktywności enzymu. Wszystkie probówki wstawić do łaźni o temperaturze 30°C i po 5 min rozpocząć reakcję enzymatyczną substratem, czyli dodać do każdej probówki (z wyjątkiem próby kontrolnej!) po 1 ml sacharozy w buforze octanowym (pH 4,7) ogrzanej do temperatury 30°C. Po 10 min reakcję przerwać, dodając do każdej probówki badanej po 2 ml kwasu 3,5-dinitrosalicylowego, a do próby kontrolnej 1 ml sacharozy. Dalej postępować jak przy oznaczeniu aktywności enzymu.

Badanie wpływu pH na szybkość reakcji:

Ten eksperyment polega na zbadaniu szybkości reakcji katalizowanej przez inwertazę w różnych pH i wskazaniu optimum pH dla tego enzymu. W tym celu należy do 4 par probówek (dla każdego pH próba kontrolna i badana) odmierzyć po 0,5 ml buforów o pH: 3,0; 5,0; 7,0 i 9,0, po czym do wszystkich probówek dodać po 0,5 ml 0,4 M roztworu sacharozy w wodzie. Wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 30°C i preinkubować 5 min. Do prób badanych dodać po 1 ml enzymu. Po 10 min do wszystkich probówek dodać po 2 ml kwasu 3,5-dinitrosalicylowego, a do prób kontrolnych 1 ml enzymu. Dalej postępować jak przy oznaczeniu aktywności inwertazy.

Opracowanie wyników:

Z krzywej wzorcowej należy odczytać liczbę mikrogramów heksoz odpowiadającą otrzymanym wartościom absorbancji dla badanych prób. Wyniki pomiarów absorbancji uśrednić i wpisać do niżej podanej tabeli. Aktywność inwertazy względem sacharozy wyrazić w mikromolach heksoz × min^{-1} × g^{-1} drożdży. Do obliczeń przyjąć masę molową 180 g/mol, czas reakcji 10 min. W tym celu należy wypełnić kolejne kolumny tabeli:

próba	śr A_{540}	µg heksoz	µmole × min^{-1}	µmole × min^{-1} × ml^{-1} nierozcieńczonego enzymu	µmole × min^{-1} × g^{-1} drożdży

Przygotować wykresy przedstawiające termostabilność enzymu i zależność aktywności od pH. Na pierwszych wykresie przedstawić procent aktywności inwertazy po działaniu różnej temperatury (40°C, 50°C i 60°C) obliczonej w stosunku do aktywności enzymu przetrzymywanego w 30°C, a na drugim zależność aktywności od pH przedstawić w procentach w stosunku do aktywności enzymu w pH 5.

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w Lublinie