

Izolowanie inwertazy – fruktohydrolazy β -D-fruktofuranozydów (EC 3.2.1.26) z drożdży i badanie jej właściwości

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wyizolowanie inwertazy z drożdży i zbadanie jej specyficzności substratowej, termostabilności oraz określenie optimum pH dla działania enzymu.

Wprowadzenie

Inwertazy (β -fruktofuranazydazy) występują u bakterii, grzybów i roślin. Rozkładają sacharozę na glukozę i fruktozę. Sacharoza jest jednym z materiałów zapasowych roślin i jest główną formą transportową węglowodanów w roślinach. Brak właściwości redukujących sprawia, że jest ona chemicznie inerta i nie ulega reakcjom redoks w trakcie transportu. Zarówno rozkład sacharozy, jak i skrobi dostarcza roślinom monocukrów – substratów glikolizy, ale cukry biorą także udział w regulacji procesów komórkowych. Sacharoza i heksozy mogą działać jako cząsteczki sygnałowe, wpływając na ekspresję genów i rozwój roślin. Ponadto cukry są zaangażowane w aktywację mechanizmów obronnych. Dlatego enzymy rozkładające sacharozę są tak ważne dla roślin.

Roślinne izoformy inwertazy różnią się lokalizacją subkomórkową, optimum pH i punktem izoelektrycznym. Inwertazy obojętne lub alkaliczne znajdują się w cytoplazmie. 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 zbadanymi izoformami są nierozpuszczalne, kwaśne inwertazy ułożone w przestrzeni apoplastycznej (inwertazy apoplastyczne, czyli związane ze ścianą komórkową). Są one modyfikowane przez N-glikozylację, a ich wypadkowy ładunek dodatni umożliwia wiązanie z ujemnie naładowanymi (kwaśnymi) składnikami ściany komórkowej. Inwertazy te pośrednio albo bezpośrednio przyczyniają się do zmiany proporcji cukrowców w komórkach, przez co grają główną rolę w regulacji procesów rozwojowych.

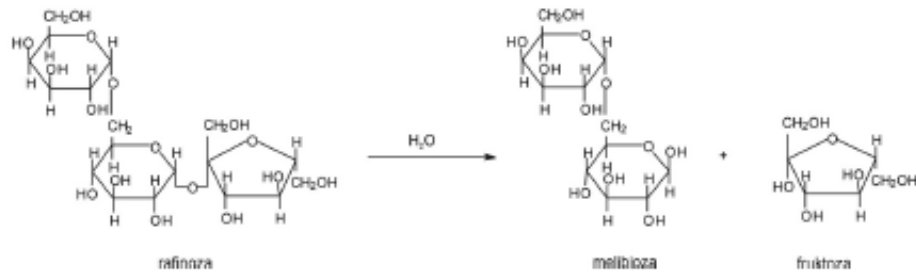
Inwertazy apoplastyczne są stymulowane przez: cukry, fitohormony, czynniki stresowe (biotyczne i abiotyczne). W dodatku w wyniku aktywacji enzymu uwalniane heksozy są cząsteczkami sygnałowymi do akumulacji fitohormonów, ekspresji

genów zaangażowanych w mechanizmy obronne i do indukcji zwrotnej inwertazy. Wiadomo, że heksozy powstałe w wyniku aktywności inwertazy związanej ze ścianą komórkową są nieodzowne do normalnego rozwoju roślin. 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 na stadiach 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 inhibitorowe.

Inwertazy występujące w organizmach grzybów są dobrze poznane, na przykład enzymy z *S. cerevisiae* czy z *Aspergillus*. Te ostatnie mają zdolność syntezy fruktoooligosacharydów i są stosowane do 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 enzymów z grzybów. W komórkach drożdży inwertaza występuje w dwóch formach: zewnętrznej, związanej ze ścianą komórkową (występującej w większości) i wewnętrznej. Obydwie formy enzymu są transkrybowane z tego samego genu *SUC2*, ale 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 zaś wchodzi do retikulum endoplazmatycznego dzięki sekwencji sygnałowej. W trakcie sekrecji i transportu do przestrzeni periplazmatycznej *via* retikulum endoplazmatyczne do enzymu są przyłączane oligosacharydy mannozowe, które mogą stanowić aż 50% masy cząsteczkowej enzymu. Oligosacharydy mannozowe prawdopodobnie pomagają w asocjacji aktywnych katalitycznie homodimerów do tetramerów, heksamerów, oktamerów o tej samej aktywności właściwej, niezależnie od stopnia asocjacji łańcuchów polipeptydowych. Inwertaza z drożdży hydrolizuje sacharozę (rys. 1), w mniejszym zaś stopniu inulinę i rafinozę (rys. 2). Mechanizm hydrolizy sacharozy zawiera w sobie katalizę nukleofilową (Asp-23) i kwasowo-zasadową (Glu-204). Zgodnie z tym mechanizmem podstawienie Asn w miejsce Asp-23 powoduje, że enzym staje się całkowicie nieaktywny. Natomiast zastąpienie Glu-204 alaniną daje 3000-krotnie mniejszą aktywność enzymu.

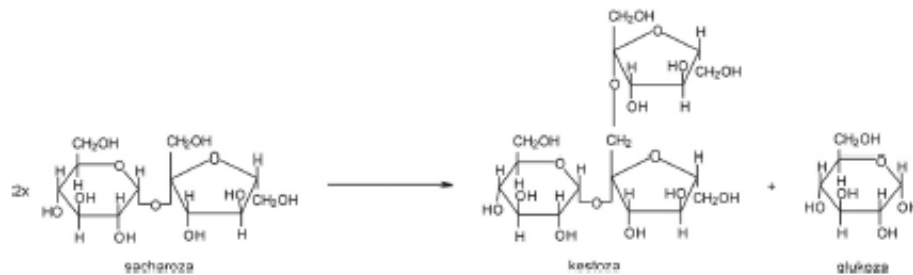


RYSUNEK 1. Reakcja hydrolizy sacharozy katalizowana przez inwertazę



RYSUNEK 2. Reakcja hydrolizy rafinozy katalizowana przez inwertazę

β -fruktofuranozydazy 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 tworzy się glukoza i trisacharyd fruktozylsacharoza (kestoza), która jest również hydrolizowana przez inwertazę (rys. 3).



RYSUNEK 3. Reakcja transferazowa inwertazy

Odczynniki i materiały

1. Drożdże piekarskie (świeże).
2. Piasek (traktowany stężonymi kwasami: azotowym, solnym i płukany wodą).
3. 0,2 M sacharoza w 0,04 M buforze octanowym o pH 4,7.
4. Uniwersalny bufor Brittona i Robinsona.
5. 0,4 M sacharoza w wodzie (do badania wpływu pH).
6. 1-procentowy kwas 3,5-dinitrosalicylowy (DNS) z 0,4 M NaOH i 1 M winianem sodowo-potasowym.
7. Wzorce glukozy i fruktozy.
8. 0,2 M rafinoza w 0,04 M buforze octanowym o pH 4,7.
9. Aceton schłodzony.

10

Wykonanie

Ekstrakcja β -fruktofuranozydazy

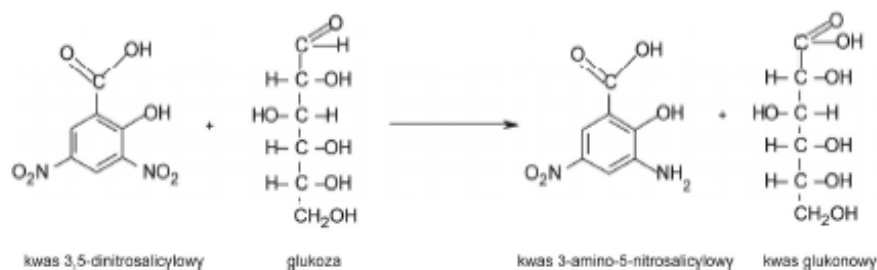
Naważkę 2,5 g drożdży piekarskich dokładnie rozetrzeć w moździerzu z 2,5 g piasku. Dodać 5 ml wody i rozcierać dalej do otrzymania homogennej konsystencji. Dodać jeszcze 5 ml wody i po wymieszaniu przelać homogenat do próbówki wirówkowej na 30 ml. Moździerz przepłukać dodatkowo 5 ml wody i połączyć wodę z homogenatem znajdującym się w próbówce. Probówki wirówkowe zrównoważyć parami, po czym wirować homogenat przez 10 minut przy szybkości 15000 obrotów na minutę ($20000 \times g$). Po odwirowaniu znajdujący się nad osadem supernatant ostrożnie przelać do cylinderka i zmierzyć objętość. Przenieść preparat do schłodzonej próbówki wirówkowej na 250 ml i dodać 5-krotną objętość zimnego acetonu. Aceton należy dodawać powoli, mieszając zawartość próbówki. Po 15 minutach inkubacji w lodzie odwirować wytrącone białka z szybkością 4500 obrotów na minutę ($3300 \times g$, 10 min., rotor uchylny). Supernatant ostrożnie przelać do pojemnika na zlewki acetonowe, a osad rozpuścić w 10 ml wody.

Oznaczanie aktywności enzymu

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.

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-procentowego roztworu kwasu 3,5-dinitrosalicylowego. W trakcie ogrzewania zachodzi reakcja oksydacyjno-redukcyjna między cukrami redukującymi i grupą nitrową w pozycji 3 kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (rys. 4). Po odpowiednim rozcieńczeniu wodą, absorbancję mierzy się przy 540 nm, a ilość powstałych heksoz określa z krzywej wzorcowej.

Oznaczenie aktywności enzymu względem sacharozy. Do 3 probówek (w tym jedna kontrolna) odmierzyć po 1 ml 0,2 M sacharozy w buforze octanowym (pH 4,7) i preinkubować 5 minut w łaźni wodnej (30°C) w celu wyrównania temperatury. Roztwór enzymu również należy ogrzać w 30°C. Po tym czasie do 2 probówek w odstępie 30 sekund dodać po 1 ml roztworu enzymu. Po 10 minutach inkubacji do wszystkich probówek dodać po 2 ml kwasu 3,5-dinitrosalicylowego, a do próbówki kontrolnej 1 ml roztworu enzymu. Wszystkie probówki wstawić do



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

wrzającej łaźni wodnej i ogrzewać przez 10 minut. Następnie schłodzić próby, do każdej dodać po 5 ml wody destylowanej i intensywnie wymieszać. Zmierzyć absorbancję prób przy 540 nm, zerując aparat na próbę kontrolną. 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. Gdy będziemy dysponować właściwym rozcieńczeniem enzymu, należy przejść do oznaczenia aktywności względem rafinozy i powtórzyć oznaczenie względem sacharozy.

Oznaczenie aktywności enzymu względem rafinozy. Do 3 probówek (w tym jedna kontrolna) odmierzyć po 1 ml 0,2 M rafinozy w buforze octanowym (pH 4,7) i preinkubować 5 minut w łaźni wodnej (30°C). Po tym czasie do 2 probówek w odstępie 30 sekund dodać po 1 ml roztworu enzymu. Inkubować 10 minut. Dalej postępować jak przy oznaczaniu aktywności inwertazy względem sacharozy.

Badanie termostabilności enzymu. Żeby przekonać się, czy białko jest termostabilne, trzeba sprawdzić, w jakich granicach temperatury aktywność enzymu nie ulega zmianie. W tym celu należy do 4 probówek odpipetować po 1 ml roztworu enzymu i jedną z probówek umieścić w łaźni o temperaturze 30°C, drugą w 40°C, trzecią w 50°C, a czwartą w 60°C i pozostawić w tych temperaturach na 30 minut. Następnie probówki ochłodzić w lodzie i przystąpić do pomiaru aktywności enzymu. Wszystkie probówki wstawić do łaźni o temperaturze 30°C i po 5 minutach rozpocząć reakcję enzymatyczną substratem, czyli dodać do każdej probówki po 1 ml sacharozy w buforze octanowym (pH 4,7) ogrzanej do temperatury 30°C. Nie zapomnieć o próbie kontrolnej, w której 1 ml enzymu (nie poddawane działaniu podwyższonej temperatury) należy inkubować równoległe z próbami. Po 10 minutach reakcje przerwać, dodając do każdej probówki 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 próbek (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 próbek dodać po 0,5 ml 0,4 M roztworu sacharozy w wodzie. Wstawić do łaźni o temperaturze 30°C i preinkubować przez 5 minut. Do prób badanych dodać po 1 ml enzymu. Po 10 minutach do wszystkich próbek 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 \times min⁻¹ \times g⁻¹ drożdży. W tym celu należy wypełnić kolejne kolumny tabeli:

Próba	śr A ₅₄₀	μg heksoz	μmole \times min ⁻¹	μmole \times min ⁻¹ \times ml nierozc. enzymu	μmole \times min ⁻¹ \times g ⁻¹ drożdży

Aktywność enzymu wobec rafinozy obliczyć w procentach, dzieląc średnią absorbancję otrzymaną w wyniku aktywności inwertazy względem rafinozy przez średnią absorbancję otrzymaną w wyniku aktywności inwertazy względem sacharozy.

Przygotować wykresy przedstawiające termostabilność enzymu i zależność aktywności od pH. Na pierwszym wykresie przedstawić procent aktywności inwertazy po działaniu różnej temperatury (40, 50 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.

Literatura

- NIZIOLEK S. 2003: Otrzymywanie β-fruktofuranozydazy z drożdży i badanie jej niektórych właściwości kinetycznych. W: Ćwiczenia z enzymologii i technik biochemicznych. Wydawnictwo SGGW, s. 29–37.
- REDDY A., MALEY F. 1996: Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase. *J. Biol. Chem.* 271: 13953–13957.
- ROITSCH T. 1999: Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2:198-206.
- SHERSON S.M., ALFORD H.L., FORBES S.M., WALLACE G., SMITH S.M. 2003: Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 54: 525–531.