**Wyznaczanie zależności prędkości reakcji enzymatycznej od pH środowiska reakcji i czasu inkubacji**

Prędkość reakcji enzymatycznej zależy od różnych czynników fizykochemicznych środowiska: temperatury, [pH](http://pl.wikipedia.org/wiki/Skala_pH), [stężenia](http://pl.wikipedia.org/wiki/Si%C5%82a_jonowa) substratu i innych. Każdy enzym wykazuje maksimum aktywności w pewnym optymalnym zakresie danego parametru. W zależności od enzymu, położenie [optimum](http://pl.wikipedia.org/w/index.php?title=Optimum&action=edit&redlink=1) może być różne, a jego zakres szerszy lub węższy. Także ogólny kształt wykresu zależności prędkości reakcji enzymatycznej danego enzymu od poszczególnych parametrów jest różny dla różnych enzymów, w zależności od ich pochodzenia, budowy itp.

**Wpływ temperatury na działanie enzymów**



Ryc. 1. Wykres zależności prędkości reakcji enzymatycznej od temperatury.

Szybkość reakcji enzymatycznych wzrasta wraz ze wzrostem temperatury, gdyż następuje wzrost [energii kinetycznej](http://pl.wikipedia.org/wiki/Energia_kinetyczna) cząstek i większa częstotliwość ich zderzeń. Wzrost prędkości reakcji w zależności od temperatury można opisać za pomocą współczynnika temperaturowego Q10, określającego jak zmienia się szybkość reakcji przy wzroście temperatury o 10 °C:



Po przekroczeniu optymalnej temperatury następuje gwałtowny spadek prędkości reakcji, co związane jest z denaturacją struktury enzymów.

Wpływ temperatury na prędkość działania enzymów nie jest prostą zależnością. Prędkość reakcji enzymatycznej wzrasta tylko w takim zakresie temperatury, w którym enzym pozostaje stabilny. Dalszy wzrost temperatury powoduje denaturację termiczną enzymów. Z reguły wzrost temperatury o 10 °C podwaja prędkość reakcji w zakresie temperatur niedenaturujących struktury enzymu (Q10=2). Zatem parametr Q10 ma zastosowanie tylko w nie denaturującym zakresie temperatur i jest on charakterystyczny dla danego enzymu. Zależy on od energii aktywacji katalizowanej reakcji. W temperaturze optymalnej prędkość reakcji enzymatycznej jest największa. Na optymalną temperaturę reakcji enzymatycznej składają się dwa procesy: wzrost szybkości reakcji związany ze wzrostem energii kinetycznej oraz wzrost szybkości denaturacji termicznej enzymu powyżej krytycznej temperatury. Gdy drugi składnik zaczyna przeważać, następuje obniżenie prędkości reakcji. Optimum temperatury dla większości enzymów znajduje się w zakresie 30-45 °C. Powyżej tego zakresu następuje obniżenie prędkości, zaś w temperaturze powyżej 60 °C enzymy ulegają nieodwracalnej denaturacji (Ryc. 1).

Większość enzymów ulega powolnej denaturacji nawet w temperaturach optymalnych i niższych niż krytyczna. Zależy to od natury samego enzymu, stopnia jego oczyszczenia w preparatach, a także od pH roztworu. Najwyższa temperatura, w której jeszcze nie zachodzi termiczna dezaktywacja enzymu w danych warunkach określa termostabilność enzymu.

**Wpływ pH na działanie enzymów**

Optimum pH, obok optimum temperaturowego, to drugi ważny parametr charakteryzujący prędkość reakcji enzymatycznej. Wpływ pH wiąże się z faktem, że enzymy jako białka posiadają wiele aminokwasów ulegających [jonizacji](http://pl.wikipedia.org/wiki/Jonizacja), a aminokwasy centrum aktywnego często mogą pełnić swoją rolę tylko w określonym stanie jonizacji. Jonizacja samych substratów oraz kompleksów enzym-substrat (ES) również wpływa na prędkość reakcji enzymatycznej. Za przykład takiego zjawiska może służyć proces hydrolizy przeprowadzany przez [pepsynę](http://pl.wikipedia.org/wiki/Pepsyna). Optimum jej działania to pH 1,0-2,0. W tych warunkach cząsteczka pepsyny bogata jest w aminokwasy dikarboksylowe i jest jeszcze ujemnie naładowanym anionem. W takim samym środowisku większość białek ma ładunek dodatni. Od stopnia jonizacji pewnych grup zależy także ogólna [konformacja](http://pl.wikipedia.org/wiki/Konformacja) cząsteczki enzymu, zapewniająca mu optymalną prędkość reakcji, a w zbyt [kwaśnym](http://pl.wikipedia.org/wiki/Moc_kwasu) czy zbyt [zasadowym](http://pl.wikipedia.org/wiki/Moc_zasady) środowisku enzym ulegnie denaturacji.



Ryc. 2. Wykres zależności prędkości reakcji enzymatycznej od pH

Wykres zależności prędkości reakcji enzymatycznej od pH ma najczęściej kształt dzwonowaty (Ryc. 2). Oznacza to, iż enzym ma największą aktywność w swoim optymalnym pH, po czym prędkość reakcji obniża się wraz z oddalaniem się od tego punktu. Zależność prędkości reakcji enzymatycznej od pH bada się w warunkach stałej temperatury oraz przy maksymalnym wysyceniu enzymu substratem, w warunkach reakcji 0-rzędu.

**Wpływ stężenia substratu na prędkość reakcji enzymatycznej**

Ruch enzymów w komórce jest na ogół bardzo wolny, bądź są one praktycznie nieruchome. To cząsteczki substratu w przestrzeni wewnątrzkomórkowej efektywnie penetrują przestrzeń zderzając się ze sobą oraz z cząsteczkami enzymu. Wzrost stężenia substratu zwiększa szanse enzymu na wytworzenie kompleksu enzym-substrat. Kompleks ten utrzymuje się do chwili, gdy substrat zostanie przekształcony w produkt lub gdy przypadkowe ruchy cieplne spowodują zwrotną dysocjację kompleksu na enzym i nieprzekształcony substrat. Enzym ma ograniczoną zdolność wiązania i przekształcania substratu. Po przekroczeniu stężenia, przy którym wszystkie miejsca aktywne enzymu zostaną wysycone substratem dalszy wzrost jego stężenia nie będzie wpływał na szybkość reakcji enzymatycznej.

***Zagadnienia do przygotowania***

1. Ogólna charakterystyka enzymów.

2. Budowa i funkcje enzymów.

3. Inaktywacja i stabilizacja enzymów.

***Cel ćwiczenia:*** Badanie zależności prędkości reakcji enzymatycznej od pH środowiska reakcji i czasu inkubacji

***Odczynniki:***

200 mM bufor boranowy (pH 9,8);

61g K2B4O7 x H20 rozpuścić w 800 ml wody dest. i doprowadzić do pH 9,8 pod kontrolą pehametru przy użyciu 200 mM KOH. Uzupełnić roztwór wodą dest. do objętości 1000 ml. Ponownie sprawdzić pH.

bufor fosforanowo-cytrynianowy wg Mc Ilvaine (pH 4,7);

2,5g kwasu cytrynowego rozpuścić w 120 ml H2O dest. Doprowadzić do pH 4,7 pod kontrolą pehametru 200mM roztworem fosforanu sodu (Na2HPO4). Ponownie sprawdzić pH.

p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy-β-D-glukopiranozyd (substrat);

138 mg p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy-β-D-glukopiranozydu rozpuścić w 60 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego wg Mc Ilvaine o pH 4,7.

0,25 mM p-nitrofenol;

7 mg p-nitrofenolu rozpuścić w 200 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego wg Mc Ilvaine (pH 4,7).

**Na stołach laboratoryjnych znajdują się odczynniki przygotowane do pracy**

**Wykonanie:**

Prędkość reakcji enzymatycznej oznaczamy w homogenatach wątroby lub nerki

**1. Oznaczanie aktywności N-acetylo-β-heksozoaminidazy**

Wykres kalibracyjny p-nitrofenolu (pNP)

Wzorzec p-nitrofenolu należy rozcieńczyć wodą wg tabeli I. Następnie do każdej probówki dodać po 1 ml buforu boranowego (pH 9,8). Ekstynkcję zmierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 410 nm i wpisać w odpowiedniej kolumnie w tabeli jej wartości (E410).

**Tabela I.**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nr próby | Objętośćwzorca [ml] | Objętośćwody [ml] | Objętość200 mMbuforuboranowego opH 9,8 [ml] | Ilość nmolip-nitrofenolu(pNP) w 1,4 mlpróby | Wartość E410 |
| 0 | - | 0,4 | 1,0 | 0 |  |
| 1 | 0,05 | 0,35 | 1,0 | 12,5 |  |
| 2 | 0,1 | 0,3 | 1,0 | 25 |  |
| 3 | 0,2 | 0,2 | 1,0 | 50 |  |
| 4 | 0,3 | 0,1 | 1,0 | 75 |  |
| 5 | 0,4 | - | 1,0 | 100 |  |

* Na podstawie otrzymanej wartości ekstynkcji (oś rzędnych) oraz znanej ilości p-nitrofenolu (oś odciętych) wykreślić na papierze milimetrowym wykres kalibracyjny p-nitrofenolu – jak na Ryc.3.

Ryc. 3. Przykładowy wykres kalibracyjny dla pNP.

**2. Zależności prędkości reakcji enzymatycznej od pH mieszaniny inkubacyjnej**

Do oznaczeń prędkości reakcji enzymatycznej należy użyć 40–krotnego rozcieńczenia homogenatu wątroby lub 200–krotnego rozcieńczenia homogenatu nerki.

Do probówek (oznakowanych od 0 do 5) dodać po 150 µl substratu oraz po 200 µl buforu fosforanowo-cytrynianowego o odpowiednim pH wg tabeli II. Następnie do tych probówek dodać po 50 µl odpowiednio rozcieńczonej próby i inkubować w łaźni wodnej o temperaturze 37ºC przez 30 minut. Po tym czasie do każdej probówki dodać 1 ml buforu boranowego (pH 9,8). Do probówki oznakowanej „0” odmierzyć 150 µl substratu, 200 µl buforu fosforanowo-cytrynianowego (pH 4,7) 1 ml buforu boranowego (pH 9,8) i 50 µl odpowiednio rozcieńczonej próby.

Oznaczanie uwolnionego pNP

Na spektrofotometrze odczytać ekstynkcję wszystkich prób od 1 do 5 przy długości fali 410 nm w stosunku do próby kontrolnej (probówki oznakowanej jako „0”) i wpisać do odpowiedniej kolumny w tabeli II. Ilość uwolnionego produktu odczytać z wykresu kalibracyjnego dla pNP. Następnie obliczyć prędkość reakcji enzymatycznej, czyli ilość nmoli rozłożonego substratu w czasie 1 minuty.

* Wszystkie otrzymane dane wpisać do odpowiednich kolumn w tabeli II.

**Tabela II**.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nr próbek | pH buforu | Wartość E410 | Średniawartość E410 | Ilość uwolnionego produktu(odczyt z wykresu kalibracyjnego pNP) | Prędkość reakcji enzymatycznej (ilość nmoli rozłożonego substratu w czasie 1 min) |
| 1 | 3,5 |  |  |  |  |
| 2 | 4,0 |  |  |  |  |
| 3 | 4,5 |  |  |  |  |
| 4 | 5,0 |  |  |  |  |
| 5 | 5,5 |  |  |  |  |

* Sporządzić w zeszycie wykres zależności prędkości reakcji enzymatycznej (oś rzędnych) od pH mieszaniny inkubacyjnej (oś odciętych).
* Wnioski oraz uwagi należy wpisać do zeszytu.

**3. Zależność prędkości reakcji enzymatycznej od czasu inkubacji**

Do oznaczeń prędkości reakcji enzymatycznej należy użyć 40 – krotnego rozcieńczenia homogenatu wątroby lub 200 – krotnego rozcieńczenia homogenatu nerki.

Do 6 probówek, oznakowanych od 0 do 5 odmierzyć po 150 µl substratu (p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy-β-D-glukopiranozyd). Następnie do każdej probówki dodać po 200 µl buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7. Probówki wstawić na 5 minut do łaźni wodnej o temperaturze 37ºC. Następnie do każdej probówki dodać po 50 µl odpowiednio rozcieńczonej próby. Do probówki oznaczonej „0” dodać natychmiast 1 ml 0,2 M buforu boranowego (pH 9,8). Zawartość pozostałych probówek inkubować w łaźni o temperaturze 37ºC. Po 15 minutach inkubacji do probówek oznakowanych numerem „1” dodać po 1 ml buforu boranowego i co kolejne 15 minut do dalszych probówek oznakowanych kolejnymi numerami.

Oznaczanie uwolnionego pNP

Na spektrofotometrze odczytać ekstynkcję wszystkich prób od 1 do 5 przy długości fali 410 nm w stosunku do próby kontrolnej (probówki oznakowanej jako „0”) i wpisać do odpowiedniej kolumny w tabeli III. Wartości stężeń powstałego pNP odczytać z wykresu kalibracyjnego dla pNP. Następnie obliczyć prędkość reakcji enzymatycznej, czyli ilość nmoli rozłożonego substratu w czasie 1 minuty. Wszystkie otrzymane dane wpisać do odpowiednich kolumn w tabeli III.

**Tabela III.**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nr próby | Czasinkubacji (minuty) | Wartość E410 | ŚredniaWartość E410 | Ilość uwolnionego produktu(odczyt z wykresu kalibracyjnego pNP) | Prędkość reakcji enzymatycznej (ilość nmoli rozłożonego substratu w czasie 1 min) |
| 1 | 15 |  |  |  |  |
| 2 | 30 |  |  |  |  |
| 3 | 45 |  |  |  |  |
| 4 | 60 |  |  |  |  |
| 5 | 75 |  |  |  |  |

* Sporządzić w zeszycie wykres zależności prędkości reakcji enzymatycznej (oś rzędnych) od czasu inkubacji (oś odciętych).
* Wnioski oraz uwagi należy wpisać do zeszytu.

***Piśmiennictwo:***

1. Bańkowski (red.), (2008): Biochemia. Podręcznik dla studentów uczelni medycznych, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, s. 37-64
2. Witwicki J., Ardelt W. (red.), (1989): Elementy enzymologii, PWN, Warszawa, s. 38-61, 230-234.
3. Stryer L., (2000): Biochemia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, s. 198-213.
4. Zwierz K., Juszkiewicz J., Arciuch L., Gindzieński A., (1992): N-acetylo-β-heksozoami­nidaza-enzym chorób Tay- Sachsa i Sandhoffa., Postępy Biochemii, t.38, nr 3, s. 127-132.
5. Ostrowska L. Zwierz K., Koniusz Z., Gindzieński A., (1993): Rola, właściwości i znaczenie kliniczne N-acetylo-β-heksozoaminidazy., Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, t. 47, nr 1, s. 67-79.
6. Zwierz K., Arciuch L., Koniusz Z., Rostkowska K., (1994) Ćwiczenia z biochemii dla studentów Wydziału Farmaceutycznego, Oficyna Wydawnicza Akademii Medycznej w Białymstoku, Białystok, s. 26-37