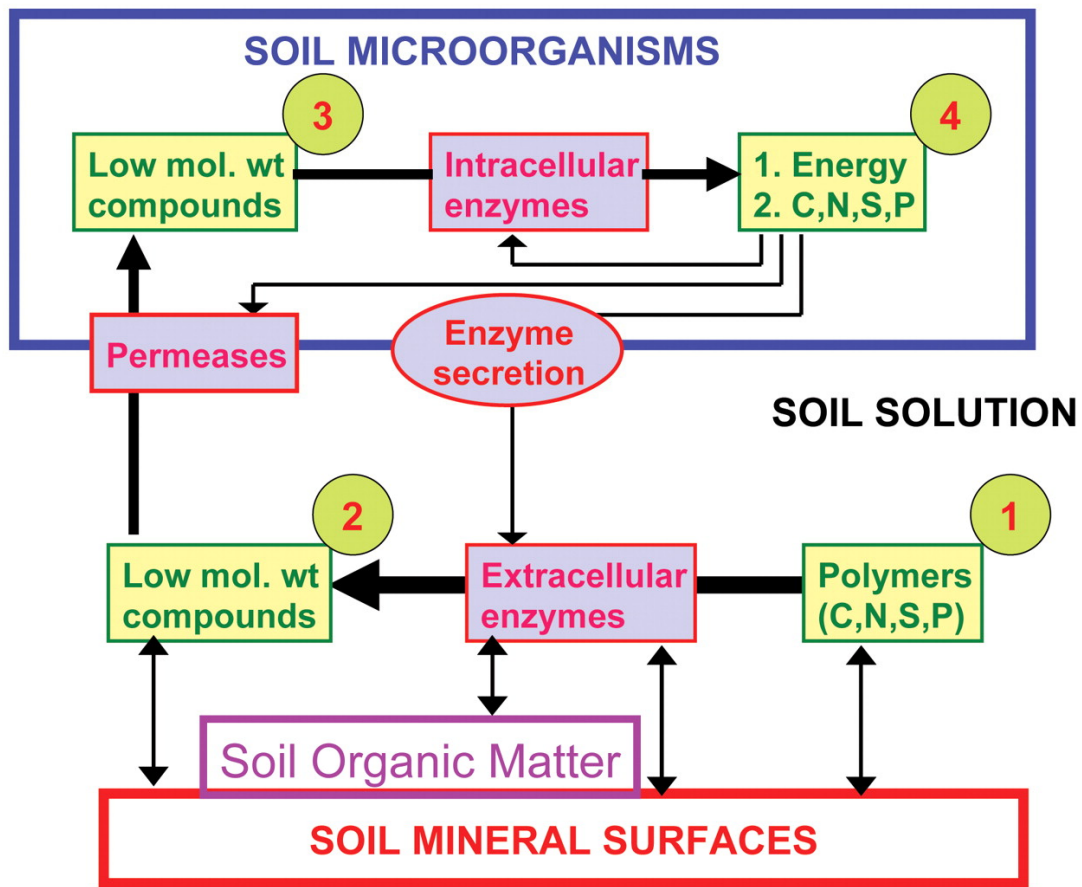


# Εργαστηριακές Ασκήσεις

## Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας

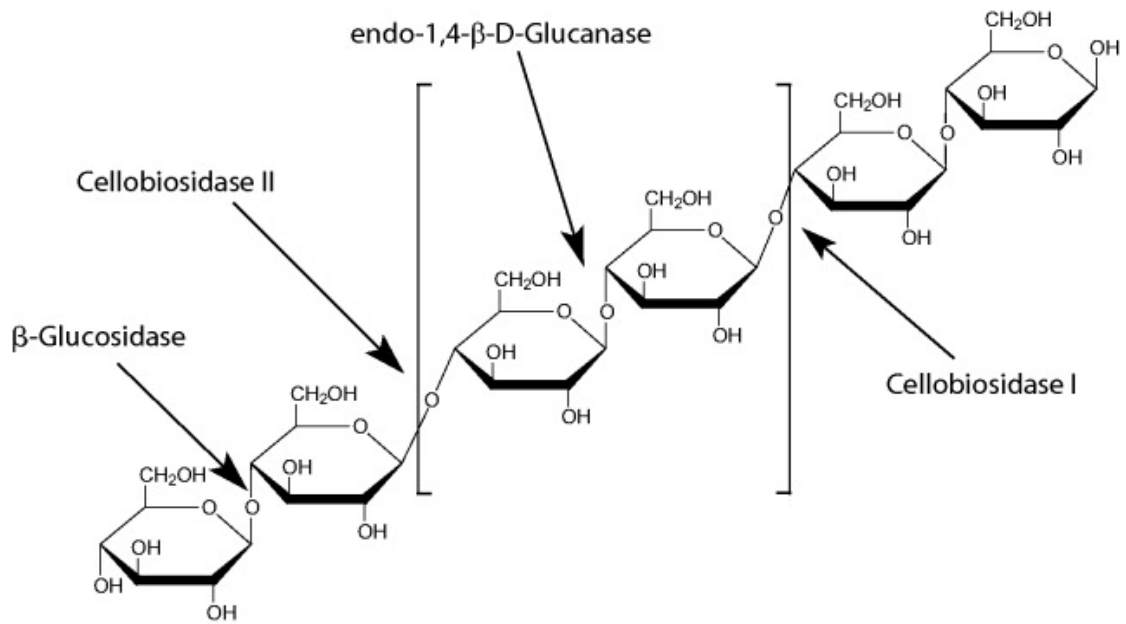


Δημήτρης Καρούζας

Λάρισα 2013

### Εργαστηριακή Άσκηση 3

Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου β-γλυκοσίδαση στο έδαφος



## Εισαγωγικά στοιχεία

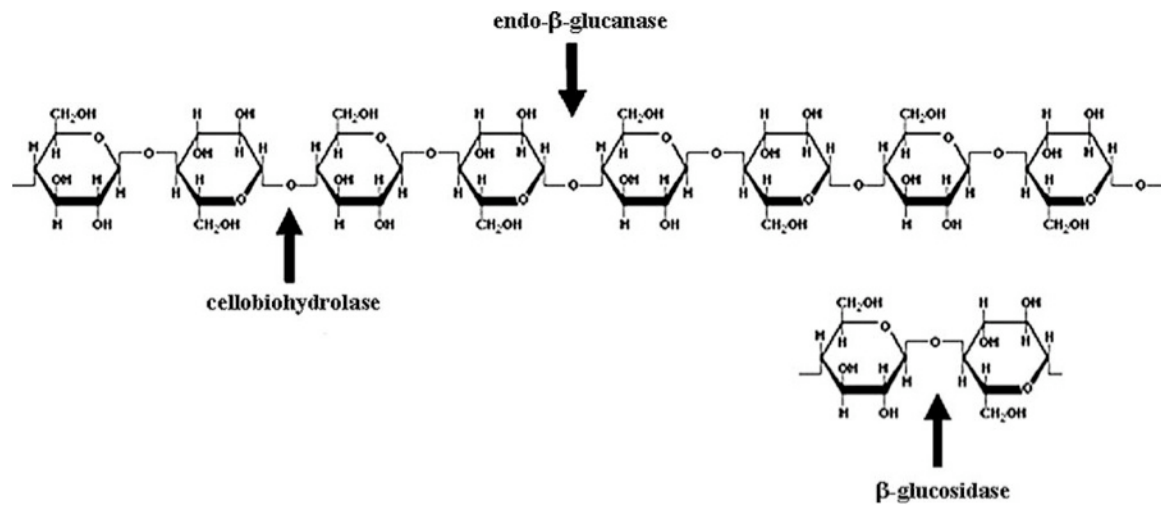
Οι μικροοργανισμοί του εδάφους αποτελούν την κύρια πηγή ενζύμων στο έδαφος (Tabatabai 1984). Τα ένζυμα, εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά, που παράγουν οι μικροοργανισμοί στο έδαφος αποτελούν τους καταλύτες των βασικότερων βιοχημικών διεργασιών που είναι απαραίτητες για την λειτουργία του εδαφικού οικοσυστήματος όπως η αποσύνθεση της οργανικής ουσίας, η λειτουργία των διαφόρων γεωχημικών κύκλων καθώς και η αποδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών (Dick 1997). Τα ένζυμα που παράγουν οι μικροοργανισμοί του εδάφους μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τον βιογεωχημικό κύκλο στον οποίο συμμετέχουν και μια λίστα αυτών παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Η μέτρηση της δραστηριότητας πολλών και διαφορετικών ενζύμων στο έδαφος έχει προταθεί ως δείκτης της οικολογικής ποιότητας και λειτουργίας ενός εδαφικού οικοσυστήματος καθώς μπορούν να προσδιοριστούν με σχετικά απλές μεθόδους και είναι ευαίσθητα σε εξωγενείς καταπονήσεις (Nannipieri et al., 2002). Τα ένζυμα που παράγονται από τους μικροοργανισμούς στο έδαφος παρουσιάζουν αρκετές ιδιαιτερότητες σε σχέση με ένζυμα από άλλους οργανισμούς. Έτσι α) παρουσιάζουν υψηλότερη ανθεκτικότητα σε έκθεση σε αναστολείς ή αντίξοες συνθήκες όπως πρωτεάσες, υψηλές θερμοκρασίες, ακτινοβολία ή παρατεταμένη αποθήκευση (Gianfreda and Ruggiero 2006), β) παρουσιάζουν διαφορετική κινητική σε σχέση με τα ένζυμα σε καθαρή μορφή, δηλαδή εμφανίζουν χαμηλότερη  $V_{max}$  και υψηλότερη  $K_m$  που σημαίνει ότι χαρακτηρίζονται από χαμηλότερη αποτελεσματικότητα κατάλυσης και μειωμένη συγγένεια με το υπόστρωμα και γ) παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα δράσης σε σχέση με το pH και την θερμοκρασία (Nannipieri and Gianfreda 1998). Όλα τα παραπάνω μπορούν να εξηγηθούν από την ύπαρξη των ενζύμων εκτός από την ελεύθερη μορφή, και ως ακινητοποιημένα ένζυμα σε εδαφικά κολλοειδή δρώντας δηλαδή σε ένα ετερογενές σύστημα.

**Πίνακας 1.** Ένζυμα που παράγουν οι μικροοργανισμοί του εδάφους και έχουν καθοριστικό ρόλο στους γεωχημικούς κύκλους C, N, P και S.

EC Number	Όνομα ενζύμου	Γεωχημικός Κύκλος	Ρόλος
3.2.1.21	β-γλυκοσιδάση	C	Υδρόλυση κυτταρίνης
3.2.1.21	α-γαλακτοσιδάση	C	Υδρόλυση μελιβιόζης
3.2.1.37	ξυλοσιδάση	C	Υδρόλυση ξυλοβιόζης
3.2.1.30	β-γλυκοσαμινιδάση ή χιτινάση	C, N	Υδρόλυση χιτίνης
3.4.11.1	Αμινοπεπτιδάση Λευκίνης	N	Ανοργανοποίηση οργανικού N
3.4.11.2	Αμινοπεπτιδάση Αλανίνης	N	Ανοργανοποίηση οργανικού N
3.5.1.5	Ουρεάση	N	Ανοργανοποίηση οργανικού N
3.1.3.2	Φωσφατάσες	P	Ανοργανοποίηση οργανικού P
3.1.6.1	αρυλσουλφατάση	S	Ανοργανοποίηση οργανικού S

Ανάμεσα στα ένζυμα που συμμετέχουν στο κύκλο του άνθρακα οι γλυκοσιδάσες (EC.3.2.1) αποτελούν μια σημαντική ομάδα ενζύμων που παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση μικρομοριακών υδατανθράκων οδηγώντας στην ελευθέρωση σακχάρων που αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας για πλήθος μικροοργανισμών. Οι γλυκοσιδάσες διαχωρίζονται ανάλογα με τον είδος του δεσμού που διασπούν. Έτσι οι α-γλυκοσιδάσες (E.C. 3.2.1.20) καταλύουν την υδρόλυση α-D-γλυκοκυρανοσιδίων ενώ οι β-γλυκοσιδάσες (E.C. 3.2.1.21) καταλύουν την υδρόλυση β-D-γλυκοκυρανοσιδίων και εμπλέκονται στην υδρόλυση μαλτόζης και κελλοβιόζης αντίστοιχα. Άλλες σημαντικές γλυκοσιδάσες είναι οι α-γαλακτοσιδάσες (E.C. 3.2.1.2) και οι β-γαλακτοσιδάσες (E.C. 3.2.1.23) που καταλύουν την υδρόλυση της μελιβιόζης και λακτόζης αντίστοιχα. Ανάμεσα στις γλυκοσιδάσες που μπορούν να παράγουν οι μικροοργανισμοί του εδάφους, οι β-γλυκοσιδάσες αποτελούν την κύρια ομάδα στο έδαφος. Οι β-γλυκοσιδάσες έχουν συσχετιστεί με ετερότροφους μικροοργανισμούς και κυρίως με μύκητες και ζύμες (Hayano and Tubaki 1985). Παλαιότερες μελέτες έχουν καταδείξει την θετική σημαντική συσχέτιση με τον συνολικό οργανικό και μικροβιακό C του εδάφους (Turner et al. 2002). Οι β-γλυκοσιδάσες καταλύουν την υδρόλυση των β-D-γλυκοσιδίων και είναι υπεύθυνες για το τελευταίο και ρυθμοκαθοριστικό βήμα κατάλυσης της κυτταρίνης στο έδαφος (Εικόνα 1). Τα προϊόντα της υδρόλυσης των β-γλυκοσιδίων αποτελούν σημαντική πηγή ενέργειας για τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Για όλους τους παραπάνω

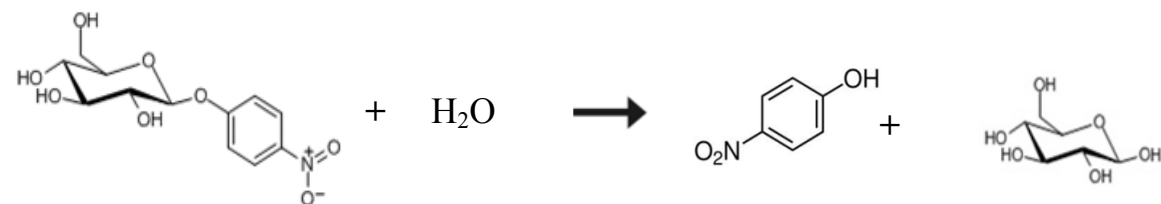
λόγους η δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης έχει προταθεί και ως μέτρο εκτίμησης της βιολογική ποιότητα του εδάφους.



**Εικόνα 1.** Η αποδόμηση της κυτταρίνης αρχικά ξεκινά με διάσπαση της από ενδό-β-1,4-γλυκανάσες (E.C. 3.1.2.4) σε μικρότερες δομικές μονάδες ολιγοσακχαριδίων. Στην συνέχεια η υδρολάση της κελοβιόζης (cellobiohydrolase, EC3.1.2.91) διασπά τα ολιγοσακχαρίδια σε διμερή κελοβιόζης τα οποία διασπώνται παραπέρα σε μονομερή γλυκόζης με την δράσης της β-γλυκοσιδάσης.

### Μέθοδος προσδιορισμού β-γλυκοσιδάσης

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της β-γλυκοσιδάσης έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Eivazi and Tabatabai, (1988). Η μέθοδος αυτή είναι βασισμένη στον φωτομετρικό προσδιορισμό της *παρα*-νιτροφαινόλης που απελευθερώνεται από τη δράση της β-γλυκοσιδάσης, όταν τα δείγματα εδάφους επωάζονται με κατάλληλο υπόστρωμα όπως το *π*-νιτροφαινόλο-β-*D*-γλουκοσίδιο (Εικόνα 1).



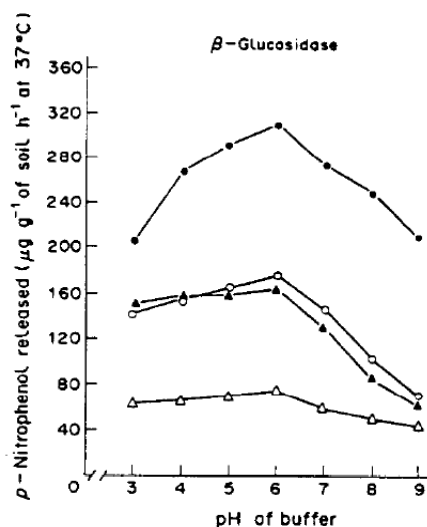
**Εικόνα 2.** Η αντίδραση υδρόλυσης του *π*-νιτροφαινόλο-β-*D*-γλουκοσίδιο από τις β-γλυκοσιδάσες με τελικό προϊόν την παραγωγή *παρα*-νιτροφαινόλης η συγκέντρωση της οποίας προσδιορίζεται φωτομετρικά

### Αντιδραστήρια

- Τολουένιο
- Διάλυμα π-νιτροφαινυλο-β-D-γλουκοσιδίου (PNG) 0.05M.
- Ρυθμιστικό διάλυμα THAM 0.1M, pH 12
- Ρυθμιστικό διάλυμα MUB pH 6.0.
- Διάλυμα CaCl<sub>2</sub> 0.5M.
- Διάλυμα αναφοράς πάρα-νιτροφαινόλης συγκέντρωσης 1000 μg/ml.

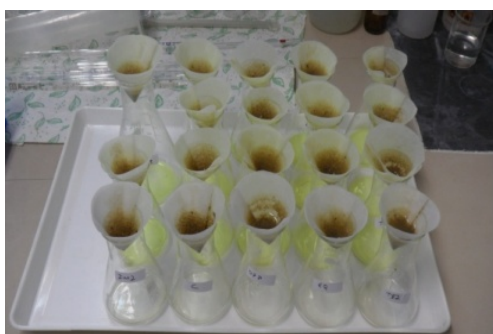
### Πειραματική Διαδικασία

1. Ποσότητα 1 g εδάφους από κάθε δείγμα τοποθετείται σε κωνικές φιάλες των 50 ml.
2. Ακολούθως προστίθενται στις κωνικές φιάλες 0.25 ml τολουένιο, 4 ml MUB pH 6.0 και 1 ml PNG που αποτελεί το υπόστρωμα υδρόλυσης των β-γλυκοσιδασών για την απελευθέρωση της παρα-νιτροφαινόλης. Το τολουένιο που προστίθεται αποτελεί πλασμολυτικό και αντισηπτικό παράγοντα και έχει ως στόχο να παρεμποδίσει την σύνθεση νέων ενζύμων από ζωντανά κύτταρα κατά την διάρκεια της μέτρησης και να ελευθερώσει πιθανές ποσότητες ενδοκυτταρικών ενζύμων. Η τιμή pH 6 αποτελεί και την βέλτιστη τιμή pH για την δραστικότητα των β-γλυκοσιδασών όπως αποδείχθηκε σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα σε εύρος pH και τα αποτελέσματά τους φαίνονται στην Εικόνα 3.



**Εικόνα 3.** Η επίδραση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος στον προσδιορισμό της δραστικότητας του ενζύμου β-γλυκοσιδάση σε διαφορετικά εδάφη.

3. Τα δείγματα αναδεύονται σε Vortex
4. Καλύπτονται με parafilm και τοποθετούνται σε σκοτεινό θάλαμο επώασης για 1 ώρα στους 37°C. *Αύξηση της θερμοκρασίας θα οδηγήσει και σε αύξηση της δραστηρότητας του ενζύμου το οποίο αδρανοποιείται στους 70°C.*
5. Αμέσως μετά στα δείγματα προστίθενται 1ml CaCl<sub>2</sub> 0.5M και 4ml THAM buffer 0.1M, pH 12. *Τα δύο αυτά αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση της πάρα-νιτροφαινόλης που έχει παραχθεί από την υδρόλυση του PNG, υποστρώματος της β-γλυκοσιδάσης.*
6. Ακολουθεί ανάδευση και διήθηση του υπερκείμενου σε ηθμό Whatman 42 (Εικόνα 2).
7. Για την προετοιμασία των δειγμάτων του μάρτυρα αναφοράς, θα ακολουθηθεί η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι το διάλυμα PNG θα προστεθεί ακριβώς πριν από την διήθηση. *Οι μάρτυρες αυτοί χρησιμοποιούνται ώστε να διορθώσουμε τις μετρήσεις μας για την πιθανή παρουσία ιχνών πάρα-νιτροφαινόλης στο υπόστρωμα της β-γλυκοσιδάσης (PNG) καθώς και πιθανή εκχύλιση χρωματισμένων εδαφικών κολλοειδών από τα CaCl<sub>2</sub> – THAM.* Τα δείγματα του μάρτυρα αναφοράς θα χρησιμοποιηθούν για τον μηδενισμό του φωτομέτρου.
8. Η απορρόφηση όλων των δειγμάτων θα προσδιοριστεί στα 420 nm.



**Εικόνα 4.** Διαδικασία προσδιορισμού της δραστηρότητας των β-γλυκοσιδασών του εδάφους: (αριστερά) στάδιο διήθησης των εδαφικών διαλυμάτων και (δεξιά) τελικά διηθήματα πριν την φωτομέτρηση

### Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου β-γλυκοσιδάση στο έδαφος

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της β-γλυκοσιδάσης στο έδαφος θα πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης της *πάρα*-νιτροφαινόλης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, παρασκευάστηκαν αρχικά πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 1, 2, 3, 4 και 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  *πάρα*-νιτροφαινόλης. Για το σκοπό αυτό, 1 ml από το πρότυπο διάλυμα *πάρα*-νιτροφαινόλης συγκέντρωσης 1000  $\mu\text{g/ml}$  διαλύθηκε σε 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  και ακολούθησε ανάδευση (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Στη συνέχεια, 0, 1, 2, 3, 4, και 5 ml από το αραιωμένο πρότυπο διάλυμα μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες όπου προστέθηκε νερό 5, 4, 3, 2, 1 και 0 ml αντίστοιχα, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 5 ml. Έτσι τα τελικά διαλύματα που προκύπτουν έχουν αντίστοιχα συγκεντρώσεις *πάρα*-νιτροφαινόλης 0, 1, 2, 3, 4 και 5  $\mu\text{g/ml}$ . Τέλος, προστέθηκαν 1ml  $\text{CaCl}_2$  0.5M και 4ml  $\text{NaOH}$  0.5M και ακολούθησε διήθηση και φωτομέτρηση στα 420nm. Θα πρέπει να τονιστεί ότι το εύρος των συγκεντρώσεων *πάρα*-νιτροφαινόλης στα πρότυπα διαλύματα που θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα με την ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου και κατά συνέπεια τις συγκεντρώσεις *πάρα*-νιτροφαινόλης που ελευθερώνονται στο έδαφος από την δράση του ενζύμου. Με βάση τις τιμές απορρόφησης και τις συγκεντρώσεις *πάρα*-νιτροφαινόλης στα πρότυπα διαλύματα θα κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη που θα χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου. Σε περίπτωση που οι τιμές απορρόφησης των δειγμάτων είναι υψηλότερες από την μέγιστη τιμή της πρότυπης καμπύλης μπορούν να προετοιμαστούν από το πρότυπο διάλυμα *πάρα*-νιτροφαινόλης (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) αραιωμένα πρότυπα διαλύματα 10 και 20  $\mu\text{g/ml}$  και να μετρηθεί η απορρόφηση τους όπως περιγράφηκε παραπάνω ώστε να ενσωματωθούν στην πρότυπη καμπύλη.



## Υπολογισμοί

Συγκέντρωση (μg/ml)	Απορρόφηση (420 nm)
0	
1	
2	
3	
4	
5	
10	
20	

Με βάση τα παραπάνω κατασκευάστε πρότυπη καμπύλη ώστε να υπολογίσετε την δραστικότητα της β-γλυκοσιδάσης στο δείγμα σας.

## Βιβλιογραφία

1. Dick RP (1997) Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR (eds) Biological indicators of soil health. CABI, Wallingford, Oxfordshire, pp 121–156
2. Eivazi F., Tabatabai MA. (1988) Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 601-606
3. Gianfreda L, Ruggiero P (2006) Enzyme activities in soil. In: Nannipieri P, Smalla K (eds) Soil biology, vol 8, Nucleic acids and proteins in soil. Springer, Berlin, pp 257–311
4. Hayano K, Tubaki K. (1985) Origin and properties of  $\beta$ -glucosidase activity in tomato-field soil. *Soil Biology and Biochemistry* 17: 553-557.
5. Nannipieri P, Gianfreda L (1998) Kinetics of enzyme reactions in soil environments. In: Huang PM, Senesi N, Buffle J (eds) Environmental particles – structure and surface reactions of soil particles. Wiley, New York, pp 449–479
6. Nannipieri P, Kandeler E, Ruggiero P (2002) Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns RG, Dick RP (eds) Enzymes in the environment. Activity, ecology and applications. Marcel Dekker, New York, pp 1–33
7. Tabatabai, M.A., 1994. Soil enzymes. In: Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomley, P.S. (Eds.), *Methods of Soil Analysis: Microbiological and Biochemical Properties*. Part 2. SSSA Book Ser. 5. SSSA, Madison, WI, pp. 775–833.
8. Turner BL, Hopkins DW, Haygarth PM, Ostle N. (2002)  $\beta$ -glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology* 20: 157-162