

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

KATEDRA CHEMIE

Enzymy a jejich reakce

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Jakub Král

Přírodovědná studia, obor Chemie se zaměřením na vzdělávání

Vedoucí práce: Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.

Plzeň, 2014

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

Plzeň, 30. června 2014

.....
vlastnoruční podpis

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce doc. Mgr. Václavu Richtrovi CSc. za ochotu, konzultace a odborné vedení při psaní této bakalářské práce.

Dále bych rád poděkoval společnosti Plzeňský Prazdroj a.s. za poskytnutí informací a materiálu k této bakalářské práci.

Obsah

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Enzymy.....	8
2.2	Názvosloví.....	8
2.3	Historie.....	11
2.4	Struktura.....	12
2.5	Izolace.....	13
2.6	Měření aktivity.....	13
2.7	Jednotka enzymové aktivity.....	14
2.8	Kinetika.....	15
2.8.1	Jednosubstrátové reakce.....	16
2.8.2	Dvousubstrátové reakce.....	16
2.8.3	Třisubstrátové reakce.....	16
2.8.4	Rovnice Michaelise a Mentenové.....	16
2.8.5	Fyzikální vlastnosti ovlivňující aktivitu enzymové reakce.....	19
2.8.6	Inhibice.....	20
2.9	Použité metody v experimentální části.....	24
2.9.1	α -amylasa.....	24
2.9.2	Peroxidasa.....	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
3.1	Závislost rychlosti štěpení škrobu α -amylasou na pH.....	27
3.1.1	Pomůcky.....	27
3.1.2	Chemikálie.....	27
3.1.3	Postup.....	27
3.1.4	Výsledky.....	30
3.1.5	Závěr.....	37
3.2	Stanovení aktivity peroxidasy.....	39
3.2.1	Pomůcky.....	39
3.2.2	Chemikálie.....	39
3.2.3	Postup.....	39
3.2.4	Vyhodnocení.....	43

3.2.5	Výsledky.....	46
3.2.6	Závěr.....	46
4	ZÁVĚR.....	47
5	RESUMÉ.....	48
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	49

1 ÚVOD

Pro rozšíření nabídky možností experimentů v základním cvičení z biochemie se nabízí některé možnosti modifikací. Tato práce je zaměřena hlavně na využití amylasy, obsažené v různých zdrojích. Vzhledem k regionálním podmínkám je inspirativní výskyt amylasy v zeleném sladu, který je jedním z meziproductů při výrobě piva v pivovarském průmyslu. Dalším dostupným zdrojem amylasy jsou lidské sliny, ve kterých je enzym rovněž obsažen.

Běžně se amylasa získává před prováděním enzymatických reakcí. Proto se nabízí otázka, zda je možno amylasu připravit do zásoby pro následné využití. Další otázky jsou, zda, a jak se mění aktivita amylasy ze sladu v průběhu jeho klíčení, jak se liší aktivity amylas získaných z různých zdrojů, a jaké jsou hodnoty pH optima u α -amylas. I touto problematikou se práce zabývá.

Pozornost je věnována také peroxidase, která se běžně připravuje před prováděním enzymatických reakcí. Práce zjišťuje, zda se mění aktivita tohoto enzymu v závislosti na době uskladnění extraktu. Zdrojem tohoto enzymu je například křenový kořen, krmná řepa, brambory, cukrovka, pšeničná mouka a pšeničné otruby.

Součástí práce je rovněž základní pohled na problematiku enzymatických reakcí, uváděných v literatuře.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Enzymy

Enzymy jsou biokatalyzátory bílkovinného (jednoduché i složeného) charakteru, urychlující chemické reakce v živých organismech. Jsou velice různorodé, protože katalyzují nejrůznější typy chemických reakcí. Dle reakcí, které katalyzují, se rozdělují do šesti hlavních tříd. Enzymy jsou přítomny ve všech živých organismech a jejich počet se odhaduje na miliardy. Tyto biokatalyzátory snižují aktivační energii, urychlují reakce a neovlivňují složení rovnovážné směsi stejně jako umělé katalyzátory. Ovšem enzymy jsou mnohem efektivnější než umělé katalyzátory. ¹

1. Jsou účinnější. Vykazují o 6 až 12 řádů vyšší rychlost reakce než reakce nekatalyzovaná a o několik řádů vyšší než reakce s umělým katalyzátorem.
2. Vyžadují mírnější podmínky reakce. Ta probíhá téměř při neutrálních hodnotách pH, teplotách mezi 20 – 40 °C a za atmosférického tlaku. Na rozdíl od umělých katalyzátorů, které často probíhají za náročných podmínek.
3. Mají značnou substrátovou specifitu a tvoří specifitější produkty. Enzymatické reakce málokdy tvoří vedlejší produkty.
4. Dají se snadněji regulovat. Katalytické schopnosti enzymů jsou ovlivňovány přítomností jiných sloučenin, než je substrát. ²

2.2 Názvosloví

Při úvodních studiích byly enzymy často pojmenovávány triviálně, převážně s koncovkou –in. Některé názvy byly zachovány dodnes (např. trypsin). Poté se enzymům začala přidávat přípona „asa“ (J. Duclaux 1883) a název byl tvořen dle typu katalyzované reakce (oxidasa, hydrolasa, transaminasa), nebo dle substrátu (amylasa, lipasa). ¹

Jelikož v dřívějších dobách neexistovalo systematické názvosloví enzymů, docházelo občas k tomu, že existovala dvě jména pro jeden enzym, nebo jeden název pro dva enzymy. ² Při nastalém zmatku a stále rostoucím počtu nově objevených enzymů se

v roce 1961 rozhodla Mezinárodní unie biochemie (IUB) zavést systémové (racionální) rozdělení.¹

Systémové názvy enzymů zahrnují substrát (příp. substráty) a typ katalyzované reakce. Enzymy se dle typu katalyzované reakce řadí do šesti hlavních tříd (tabulka 1). Těchto šest tříd se dále dělí na příslušné podtřídy a nižší kategorie.²

Tabulka 1: Klasifikace enzymů, dle typu katalyzované reakce¹

Klasifikace	Typ katalyzované reakce
1. Oxidoreduktasy	oxidačně-redukční reakce
2. Transferasy	přenos funkčních skupin
3. Hydrolasy	hydrolýza
4. Lyasy	eliminace skupin za vzniku dvojných vazeb
5. Izomerasy	izomerace
6. Ligasy	tvorba vazeb spojená s hydrolýzou ATP

1. Oxidoreduktasy

- katalyzují oxidačně redukční přeměny
- všechny jsou povahy složených bílkovin
- jedna z nejpočetnějších tříd enzymů
- oxidoredukční děj je tvořen přenosem atomu vodíku (transhydrogenasa, či dehydrogenasa), nebo elektronů (transelektronasa)
- dělení na podtřídy dle funkčních skupin¹

2. Transferasy

- přenos funkčních skupin (-CH₃, -NH₂, atd.) z donoru na akceptor
- početná skupina enzymů povahy složených bílkovin
- účastní se biosyntetických dějů
- dělení do podtříd dle přenášených skupin¹

3. Hydrolasy

- hydrolyticky štěpí vazby vznikající kondenzací (např. amidové, esterové)
- početná skupina enzymů, většinou povahy jednoduchých bílkovin
- dělení do podtříd dle typu štěpených vazeb ¹

4. Lyasy

- katalyzují nehydrolytické štěpení a vznik vazeb C-C, C-O, C-N, atd.
- odštěpují, nebo přinášejí malé molekuly do substrátu (H₂O, NH₃, atd.)
- málo početná skupina enzymů povahy složených bílkovin
- v triviálních názvech je označujeme většinou jako synthasy
- dělení do podtříd dle typu štěpených, nebo syntetizovaných vazeb ¹

5. Isomerasy

- přesuny atomů a jejich skupin uvnitř molekul
- nejméně početná skupina enzymů převážně povahy jednoduchých bílkovin
- dělení do podtříd dle typu vytvářené izomerie ¹

6. Ligasy

- katalyzují vznik energeticky náročných vazeb a zároveň rozkládají látky uvolňující energii
- málo početná skupina povahy složených bílkovin, podílí se na různých biosyntézách
- v triviálních názvech je označujeme většinou jako synthetasa
- dělení do podtříd dle typu vytvářených vazeb ¹

Každý enzym se značí dvěma názvy a čtyřmi čísly. Doporučený název je praktický pro běžné používání a většinou odpovídá dříve používanému triviálnímu názvu. Systematický název slouží k přesnému označení enzymu, aby se předešlo možné záměně. Tvoří se názvem substrátu s příponou „asa“ označující enzymem katalyzovaný typ reakce

dle hlavní klasifikační třídy (tabulka 1).² Přiřazení čtyřmístného kódu je umožněno rozdělením enzymů do hlavních tříd, soustavy podtříd a skupin. Systémové číslo odpovídá zařazení enzymu v klasifikaci EC (Enzyme Commission).¹ Například pro enzym karboxypeptidasa A (doporučený název) se systematickým názvem peptidyl-L-aminocidhydrolasa, bude systémové číslo: EC 3.4.17.1. První číslo představuje hlavní třídu enzymu (Hydrolasa, viz tabulka 1), druhé číslo značí podtřídu (peptidová vazba), třetí číslo v pořadí vyjadřuje číslo jeho podskupiny (metalokarboxypeptidasy) a čtvrté číslo je pořadové číslo enzymu v podskupině.²

Systémové názvy nejsou praktické pro běžné používání. Proto je spolu se systémovým číslem využíváme, pokud není zapotřebí jinak, pouze při „představení“ enzymu a dále upřednostňujeme název doporučený.¹

2.3 Historie

Věda zabývající se poznáváním enzymů se nazývá enzymologie. První informace o existenci biokatalyzátorů pochází již z 18. století, kdy byly popsány trávicí účinky žaludeční šťávy. Roku 1834 J. Berzelius popisoval výskyt katalyzovaných reakcí v rostlinách a živočiších. V těchto dobách se však biokatalyzátory nazývaly fermenty, protože se předpokládala jejich účast v rozkladných fermentačních dějích v přírodě. Od roku 1878 používáme Kühneho označení „enzym“ (z řeckého en zýme – v kvasnicích).¹

Bílkovinou povahu enzymů prokázal roku 1926 J. Summer, když vykryštoval enzym ureasu, která katalyzuje hydrolýzu močoviny na amoniak a oxid uhličitý.² Bílkovinou povahu, ale tušil již roku 1840 J. von Liebig a 38 let později M. Traube. Studium enzymů však datujeme ještě dříve. V roce 1814 byl popsán první enzym, a to amylasa ze sladu. Poté byla popsána amylasa ve slinách a žaludeční proteasa pepsin v letech 1830 - 1840. První představy o mechanismu účinku enzymu začaly být formovány na konci 19. století. Roku 1894 přišel E. Fischer s teorií komplementarity (enzymová reakce probíhá v malé oblasti molekuly enzymu, zámek a klíč) a V. Henry s představou, že se během enzymatické reakce tvoří komplex enzym – substrát, jakožto meziprodukt. V roce 1913 zpracoval E. Michaelis s M. Mentenovou kinetiku jednosubstrátových reakcí.¹

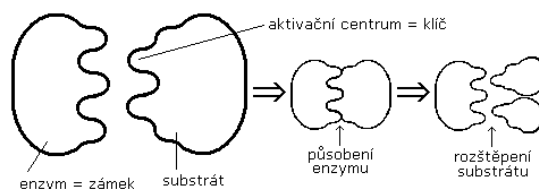
Chemie bílkovin začala studovat enzymy po prokázání jejich bílkovinné povahy a umožnila obrovský pokrok v poznávání enzymů. Dnes jich známe tisíce a velké množství z nich již bylo izolováno v čisté podobě, čemuž napomohl i velký rozvoj instrumentálních metod. Znalost chemie bílkovin přispěla k pochopení prostorové struktury a mechanismu působení enzymů. I dnes neustále roste počet enzymů se známým mechanismem katalytických účinků a známou prostorovou strukturou. ¹

2.4 Struktura

Jak již víme, enzymy mají povahu jednoduchých i složených bílkovin. Součástí enzymů povahy složených bílkovin je nízkomolekulární složka kofaktor, která přenáší skupiny, atomy, nebo elektrony během biochemických reakcí katalyzovaných enzymem. ¹ Katalytickou funkci umožňují na enzym pevně vázané prostetické skupiny, které se během katalytického cyklu enzymu obnovují. ³ Kofaktor, který je vázán na bílkovinnou složku jen slabě a může se lehce oddělit, se nazývá koenzym. Komplex koenzymu s apoenzymem tvoří holoenzym. ¹

Studiem struktury molekuly enzymů se potvrdilo tvrzení E. Fischera z konce 19. století (viz kapitola 2.3). Oblast, ve které probíhá enzymová reakce, se nazývá aktivní centrum, nebo aktivní místo. Tato oblast byla studována pozorováním aktivity enzymů se stejnou funkcí z jiných organismů, za různých chemických modifikací skupin molekuly a použitých substituentů. Až rentgenostrukturní analýza komplexů enzymů se substráty a kompetitivními inhibitory objasnila prostorové uspořádání aktivních míst. V aktivním centru se vyskytují přesně prostorově rozmístěné funkční skupiny, které jsou součástí postranních řetězců aminokyselinových zbytků. Ty jsou v polypeptidovém řetězci daleko od sebe, ale jeho svinutím se dostávají do značné blízkosti. Prostorové uspořádání bylo nejvíce studováno u hydrolas a byly zjištěny 3 základní typy uspořádání aktivního centra: ¹

1. Tvar štěrbiny (polysacharidové, polynukleotidové a polypeptidované řetězce)
2. Tvar mělké povrchové prohlubně (trávicí enzymy – trypsin, elastasa, atd.)
3. Tvar jamky (karboxypeptidasa) ¹



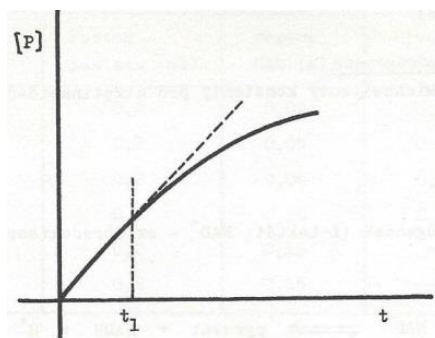
Obrázek 1: schéma enzymové reakce ⁴

2.5 Izolace

Enzymy se izolují a čistí běžnými metodami využívaných při izolaci bílkovin. Velkou výhodou enzymů oproti inaktivním bílkovinám je ta, že postup izolace můžeme sledovat měřením jejich aktivit. Intracelulární enzymy se při jejich izolaci musí nejprve rozrušit. Tkáň se rozrušuje nejčastěji mletím, či homogenizací a poté se enzymy extrahují vodou, tlumivým roztokem (pufrům), nebo alkoholem. Nerozpuštěné zbytky v extraktu se běžně oddělují filtrací nebo centrifugací. ⁵

2.6 Měření aktivity

Aktivitou enzymu se rozumí schopnost katalyzovat přeměnu substrátu na produkt. ⁶ Počáteční rychlost reakce je určována úbytkem substrátu, či tvorbou produktu v čase. Počáteční rychlost, která se řídí rovnicí Michealise a Mentenové (kapitola 2.8.4), je dle definice rychlost v čase nula, než došlo k vytvoření jakéhokoliv produktu. Počáteční rychlost reakce je složité určit experimentálně, neboť čas, během kterého se promíchávají reakční složky a měří koncentrace roztoku, není nikdy nulový. Proto se rychlost stanovuje jako přeměněné množství substrátu za čas. Ovšem pouze za čas, během kterého je změna koncentrace složky s časem lineární (viz obrázek 2). Proto lze počáteční rychlost reakce měřit pouze v časovém intervalu od 0 do t_1 . ⁵



Obrázek 2: Určení počáteční rychlosti enzymové reakce ⁵

Jednotlivé reakční složky směsi je důležité před zahájením enzymatické reakce vytemperovat 5-10 minut odděleně na určenou teplotu, neboť rozdílné teploty složek by mohly reakci ovlivnit. Při inkubaci během krátkého časového intervalu velmi záleží na přesném okamžiku zahájení pokusu. Chyba při přidání přesného objemu je totiž menší, než chyba vzniklá během inkubace při pomalém přidávání enzymu. Obsah pipety se proto do směsi většinou přidává jejím rychlým vyfouknutím.⁵

Zastavení enzymatické reakce se často provádí denaturací. Jedná se o proces charakteristický pro bílkovinné struktury. Obvykle se provádí významnou změnou pH, případně přidáním vhodného inhibitoru.⁵

2.7 Jednotka enzymové aktivity

Pro kvantitativní stanovení přítomného množství enzymu v roztoku využíváme jeho katalytické aktivity. Při tomto způsobu stanovení však musíme znát:⁵

1. chemickou podstatu a stechiometrii reakce enzymem katalyzované,
2. nutnost přítomnosti kofaktoru pro funkci enzymu,
3. K_m pro dvojici E – S (enzym – substrát), popř. E – K (enzym – koenzym),
4. vliv teploty na aktivitu a stabilitu daného enzymu,
5. pH optimum daného enzymu,
6. analytickou metodu, pomocí které sledujeme úbytek substrátu, či vznik produktu.⁵

Měření enzymatické aktivity se provádí při pH optimu a při vysoké počáteční koncentraci substrátu.⁵ Koncentrace se za určitý časový interval nemění a reakce probíhá kinetikou nultého řádu.⁷ Při zachování těchto podmínek je rychlost reakce (aktivita enzymu) úměrná pouze koncentraci enzymu.⁵

Aktivita enzymu se dříve vyjadřovala různě smluvenými jednotkami. Nejčastěji souvisely přímo se způsobem měření. Celosvětové sjednocení ve vyjadřování katalytické účinnosti enzymu přinesla roku 1961 IUB (Mezinárodní unie biochemie), kdy zavedla standardní jednotku aktivity - 1 U (z anglického unit). Standardní jednotka aktivity enzymu je takové množství enzymu, které za standardních podmínek (pH optimum, 30°C) katalyzuje při saturaci substrátem přeměnu 1 μ mol substrátu za 1 minutu. Po zavedení

jednotek SI, byla roku 1972 zavedena nová jednotka pro katalytickou aktivitu – katal. 1 kat vyjadřuje takové množství katalyzátoru, které za standardních podmínek (pH optimum, 30°C) přemění 1 mol substrátu za 1 sekundu. Jedná se ovšem o příliš velkou jednotku, a proto se v praxi používají její zlomky – mikrokatal ($\mu\text{kat} = 10^{-6} \text{ kat}$), nanokatal ($\text{nkat} = 10^{-9} \text{ kat}$). Vztah mezi starou jednotkou (U) a novou jednotkou (katal) je: $1 \text{ U} = 16,67 \text{ nkat}$.¹

Mezinárodní unie pro čistou a použitou chemii (IUPAC), pak roku 1981 zavedla pro katalytickou aktivitu vyjádřenou v katalech název - rychlost přeměny substrátu. V praxi se využívají i další veličiny: specifická katalytická aktivita (vztažená na kg enzymu, kat/kg), koncentrace katalytické aktivity (kat/dm^3) a molární katalytická aktivita (kat/mol).¹

2.8 Kinetika

Enzymy jakožto biokatalyzátory jsou mimořádně různorodé, protože provádí velice rozdílné reakce. Ukázkou reakcí z nejběžnějších enzymových tříd může být – oxidace a redukce, přenos funkčních skupin, hydrolýza, izomerie, či dehydratace. Některé enzymy působí na jedinou molekulu substrátu, kdežto jiné na dvě nebo více.²

V biochemii má velký význam studium enzymové kinetiky, protože:

1. Studium kinetiky má velkou zásluhu na tom, že může být určena maximální katalytická rychlost enzymu a vazebná afinita substrátů a inhibitorů k enzymu.
2. Kinetickými studiemi enzymatické reakce došlo k pochopení role enzymu v celkovém metabolickém ději.
3. Sledováním měnící se rychlosti enzymové reakce s reakčními podmínkami, doplněné o poznatky z chemických a strukturních studií enzymu, se vysvětluje katalytický mechanismus enzymu.
4. Většina enzymových testů je založena na studiích kinetiky enzymů.²

Kinetika enzymů se zabývá studiem časového průběhu reakcí za různých podmínek, a tím přispívá k lepšímu pochopení mechanismu účinku enzymu.¹

Rychlost reakcí katalyzovaných enzymem je různorodá a závisí na různých faktorech, jako jsou:¹

1. množství enzymu,
2. koncentrace substrátu,
3. fyzikálně chemické vlastnosti prostředí,
4. přítomnost modifikátorů (efektorů).¹

2.8.1 Jednosubstrátové reakce

Nejjednodušší enzymatické reakce přeměňují jediný substrát na jediný produkt. Takto působí především isomerasy při změně izomerů. Obecně vzato je však těchto reakcí málo. Další enzymatické reakce štěpí jediný substrát na dva produkty. S touto reakcí se setkáváme u procesů katalyzovaných lyasami. Řadíme sem i hydrolytické reakce, byť se jich účastní dvě reagující látky. Voda, která se reakce účastní, ovšem nemění svoji koncentraci během enzymového děje, a proto ji nepovažujeme za substrát.¹

2.8.2 Dvousubstrátové reakce

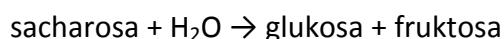
Při těchto reakcích dochází k přeměně dvou substrátů na dva produkty. Jako tomu je při působení transferas, nebo oxidoreduktas. Působení lyas, které fungují i jako syntetizující enzymy, se může tvořit pouze jediný produkt. Dvousubstrátové reakce se vyskytují nejčastěji ze všech tří typů reakcí.¹

2.8.3 Třisubstrátové reakce

Při tomto procesu, který katalyzují hlavně ligasy, dochází ke štěpení jednoho substrátu na dva produkty a zároveň se zbylé dva substráty slučují na jeden produkt. Výjimečně se vyskytují i reakce vícesubstrátové.¹

2.8.4 Rovnice Michaelise a Mentenové

První měření kinetiky enzymů provedl Adrian Brown počátkem 20. století. Kdy sledoval rychlost hydrolytického štěpení sacharosy β -fruktofuranosidasou (dříve známá jako invertasa) na fruktosu a glukosu.²

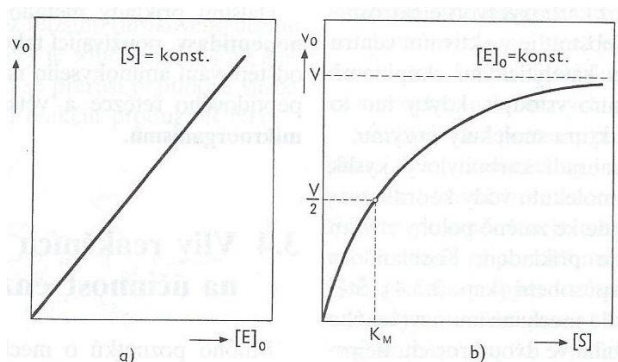


Byly odhaleny dvě skutečnosti o povaze enzymatických reakcí.

1. Je-li počáteční koncentrace sacharosy konstantní a mění se pouze množství enzymu, je počáteční rychlost reakce na koncentraci katalyzátoru lineární.

2. Je-li naopak konstantní koncentrace enzymu a mění se množství substrátu, je počáteční rychlost reakce na koncentraci sacharosy hyperbolická. ¹

Později byla pro obě hypotézy potvrzena platnost v enzymových reakcích, kterých se účastní pouze jediný substrát a je přeměněn na jediný reakční produkt. ¹



Obrázek 3: znázornění počáteční reakce ¹

Brown předpokládal, že se tato reakce skládá ze dvou dílčích reakcí. První reakce enzymu (E) a substrátu (S) tvoří jako meziprodukt komplex enzym – substrát (ES), který se při druhé reakci rozpadá na produkt (P) a enzym (E). Touto problematikou se dříve zabýval i V. Henry. ²



Obrázek 4: obecné schéma enzymové reakce ⁸

Roku 1913 navazuje L. Michaelis a M. Mentenová na práci Henriho. ² Přichází s matematickým vyjádřením saturační křivky, která umožňuje kinetické zpracování mechanismu enzymové reakce (viz obrázek 4). Saturační křivka (obrázek 3b) je závislost rychlosti enzymatické reakce na koncentraci substrátu a dle Michaelise a Mentenové vyjadřuje syčení enzymu substrátem. ¹

Rovnice Michaelise a Mentonové:

$$v = \frac{V [S]}{K_M + [S]}$$

kde V značí limitní rychlost enzymové reakce a K_M Michaelisovu konstantu, pro kterou platí:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Rovnice Michaelise a Mentenové je rovnicí rovnosé hyperboly s posunutým počátkem. Tato hyperbola je ideální pro zjištění mnoha enzymů. ¹ Je to základní rovnice kinetiky enzymů. ²

2.8.4.1 Michaelisova konstanta

Další důležitý vztah zaznamenáme, když se rychlost reakce rovná polovině limitní rychlosti. ⁵

$$v = \frac{V}{2}$$

$$\frac{V}{2} = \frac{V [S]}{K_M + [S]}$$

Z tohoto vyjádření, patrném i na obrázku 3, vyplývá, že Michaelisova konstanta se rovná koncentraci substrátu $[S]$, při které dosahuje poloviny limitní (mezní) rychlosti V . ¹ Tudiž, že Michaelisova konstanta se rovná koncentraci substrátu $[S]$, při polovičním nasycení enzymu substrátem. Proto má K_M rozměr koncentrace, tedy mol/l. ⁵ Konstanta je na koncentraci enzymu nezávislá, je ovšem závislá na podmínkách, jako jsou: teplota, pH, přítomnost efektorů atd. Proto musíme k hodnotě konstanty uvádět, za jakých podmínek byla naměřena. K_M charakterizuje afinitu příslušného enzymu k danému substrátu. Při nižší hodnotě Michaelisovy konstanty je afinita enzymu vůči substrátu vyšší. Při více substrátové reakci s více enzymy, považuje za hlavní enzym ten, který má nejnižší K_M . ¹

2.8.4.2 Limitní rychlost

Limitní (mezná) rychlost byla dříve označovaná jako V_{max} , tedy maximální rychlost. Její význam spočívá ve vztahu k rychlostní konstantě k_2 . V oblasti saturace substrátem, ve které reakční rychlost dosahuje mezní hodnoty a reakce je vzhledem k substrátu 0. řádu, se stává mezní rychlost faktorem limitující rychlost enzymové reakce. Proto platí, že:

$$v = V = k_2 [E]_0$$

Při znalosti molární koncentrace enzymu $[E]_0$ pak můžeme z naměřené hodnoty limitní rychlosti vypočítat rychlostní konstantu k_2 , která vyjadřuje molekulovou (molární) aktivitu

enzymu, dříve označovanou jako číslo přeměny. Molekulová aktivita enzymu vyjadřuje počet přeměněných molekul (molů) substrátu, při optimálních podmínkách, za jednu sekundu jednou molekulou (jedním molem) enzymu. ¹

2.8.4.3 Vliv koncentrace substrátu na rovnici Michaelise a Mentenové

Při nízkých koncentracích substrátu $[S] \ll K_M$ se časový průběh reakce řídí kinetickou rovnicí 1. řádu a rovnice Michaelise a Mentenové se redukuje na: ⁵

$$v = \frac{V [S]}{K_M} = konst. [S]$$

Při vysoké koncentraci substrátu $[S] \gg K_M$ se enzymatická reakce řídí kinetikou 0. řádu, při redukci rovnice na tvar: ⁵

$$v = \frac{V [S]}{[S]} = V = konst.$$

Pokud se koncentrace substrátu pohybuje mezi hodnotami $0,01 K_M < [S] < 100 K_M$ řídí se rovnice Michaelise a Mentenové smíšenou kinetikou 0. a 1. řádu. ⁵

2.8.4.4 Nedostatky rovnice Michaelise a Mentenové

Rovnice Michaelise a Mentenové je založena na představě, že se meziproduct (komplex ES) rozkládá přímo na produkt (P) a enzym (E). Jedná se ovšem o vícestupňovou přeměnu, která obsahuje několik komplexních meziproductů. Rovnice nadále popisuje pouze počáteční rychlost reakce a kinetiku nejjednodušších a málo vyskytovaných jednosubstrátových reakcí. Enzymologie i tak využívá rovnici Michaelise a Mentenové jako nejpoužívanější kinetický vztah. ¹

2.8.5 Fyzikální vlastnosti ovlivňující aktivitu enzymové reakce

2.8.5.1 Teplota

Teplota ovlivňuje rychlost enzymatických reakcí. Při růstu teploty vzrůstá i rychlost reakce. Rostoucí teplota ovšem současně inaktivuje enzym, protože dochází k denaturaci jeho bílkovinné části a někdy i k odštěpení kofaktoru. Výsledkem těchto protichůdných dějů je vznik křivky s maximem tzv. optimální teplota enzymu. Polohu maxima ovlivňuje jak jeho termostabilita, tak i postup měření (čas při kterém za jednotlivých teplot necháme reakci probíhat). Optimální teplota je pak vyšší, při kratší době inkubace,

protože se méně uplatňuje proces tepelné inaktivace. ¹ Při kratší době inkubace se také jednotlivé složky úplně neprohřejí např. vlivem špatné vodivosti skla (zkumavky).

2.8.5.2 pH

Aktivita enzymů, jakožto proteinů, je velmi závislá na pH prostředí, ve kterém se vyskytují. ² Většina je aktivní jen v určitém intervalu pH a mimo něj jejich aktivita klesá. Proto změnou pH ovlivníme aktivitu enzymu, tak jako k tomu nejspíše dochází v živých buňkách. ¹ Závislost aktivity enzymu na pH má tvar zvonkovité křivky, tedy křivky s maximem. Hodnota pH v maximu křivky je označována jako optimální pH, nebo pH optimum. Závislost aktivity na pH je složitá, ale zjednodušeně můžeme tvrdit, že závisí na amfoterním charakteru bílkovinné části molekuly enzymu. ⁵ Závislost aktivity enzymu na koncentraci H^+ řídí protonovatelné skupiny obsaženy v aktivních centrech a také molekuly mnoha substrátů. Reakce dvojice enzym – substrát je tedy závislá na stupni její protonace. ¹

Katalytickou aktivitu enzymu dále ovlivňují faktory, jako jsou:

1. iontová síla,
2. relativní permitivita (ovlivňující sílu nekovalentních interakcí během reakce enzymu se substrátem),
3. koncentrace enzymu,
4. koncentrace substrátu,
5. přítomnost efektorů (aktivátory a inhibátory). ¹

2.8.6 Inhibice

Rychlost reakcí značně ovlivňují látky, které nazýváme efekty. ¹ Pokud se přičiněním těchto látek zvyšuje rychlost enzymové reakce, jedná se o aktivátory, které způsobují aktivaci. V opačném případě jde o inhibitory způsobující inhibici. ⁵ Efekty se mohou dělit na přirozené a nepřirozené. Přirozené jsou součástí buněk a podílí se na regulaci metabolismu. Nepřirozené jsou obsaženy například v léčivech. ¹

Aktivátory napomáhají mnohým enzymům k jejich plné aktivitě. Vážou se vratně na molekulu enzymu. Nejčastěji to jsou ionty kovů, nebo organické látky. ¹

Inhibitorů je velké množství a vyskytují se v různých podobách. Jako jsou: ionty,

anorganické i organické látky. Vyvolávají změnu ve struktuře molekuly, čímž dělají enzym méně aktivní, nebo snižují rychlost přeměny působením na aktivní centrum se substrátem. Další možností, jak snížit rychlost reakce, je inaktivace komplexu enzym - substrát. Inhibitory mají velký význam např. v enzymologii, medicíně a hygieně (proti infekcím, tvorbě rakovinných buněk, při transplantacích), či zahradnictví a zemědělství. ¹

Inhibované reakce mohou udávat tzv. „stupeň inhibice“ (i) :

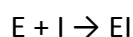
$$i = \frac{v - v_i}{v}$$

Kde v značí rychlost reakce neinhibované a v_i reakce inhibované. Poté rozdělujeme inhibice na 3 typy:

1. nekompetitivní,
2. kompetitivní,
3. akompetitivní. ⁵

Někdy se v literatuře ¹ můžeme setkat s rozdělením na klasický nekompetitivní, kompetitivní, akompetitivní a smíšený nekompetitivní typ inhibice.

Vztah mezi enzymem a inhibitorem charakterizuje inhibiční konstanta K_i . Jedná se o disociační konstantu komplexu enzym – inhibitor (EI).

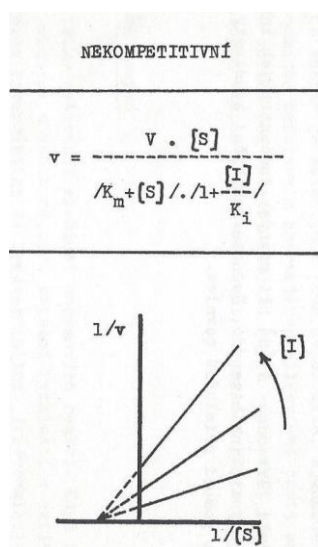


$$K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

Typ inhibice lze vyvodit ze závislosti $\frac{1}{v_i}$ na $\frac{1}{[S]}$ při různých koncentracích inhibitoru. Z příslušné rovnice se následně určí K_i . ⁵

2.8.6.1 Nekompetitivní typ inhibice

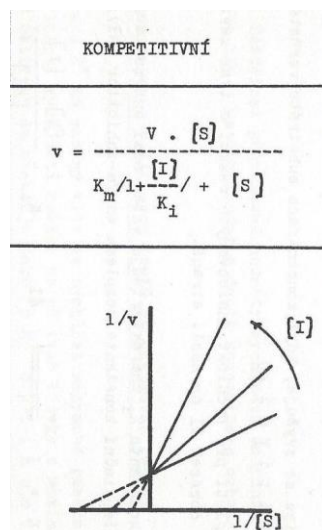
Koncentrace substrátu neovlivňuje stupeň inhibice.⁵ Snižuje se rychlost přeměny na produkt a nedochází k ovlivnění vazby substrátu na enzym. Přítomnost nekompetitivního inhibitoru nemění Michaelisovu konstantu ($K'_M = K_M$), ale snižuje limitní rychlost enzymové reakce ($V' < V$). Stejně jako většina přirozených inhibitorů, tak i nekompetitivní vykonávají důležité regulační funkce během metabolických dějů. Nekompetitivní inhibitory se vážou mimo aktivní centrum a vazbou vyvolávají šíření změn struktury, čímž jeho konformaci mění na inaktivní.¹



Obrázek 5: Nekompetitivní typ inhibice⁵

2.8.6.2 Kompetitivní typ inhibice

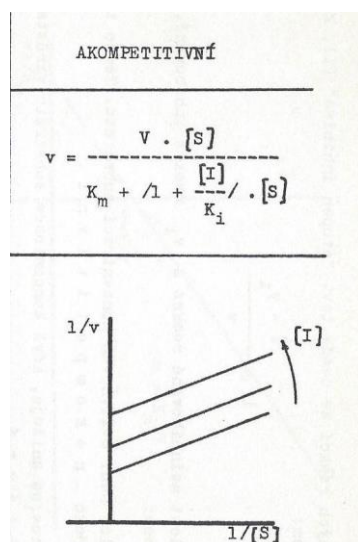
Vzrůstající koncentrací substrátu dochází ke snížení stupně inhibice.⁵ Kompetitivní inhibitor inaktivuje enzym zajímavým způsobem. Má totiž velice podobnou strukturu jako substrát. Enzym nerozezná inhibitor od substrátu a místo komplexu ES tvoří komplex s inhibitorem a nedochází ke tvorbě produktu. Ovšem vzniklý komplex je vratný a substrát tak soutěží o aktivní místo enzymu. Poté záleží na koncentraci látek a na jejich afinitě k enzymu. Kompetitivní inhibitor neovlivňuje limitní rychlost ($V = V'$), ale zvyšuje K_M ($K'_M > K_M$).¹



Obrázek 6: Kompetitivní typ inhibice ⁵

2.8.6.3 Akompetitivní typ inhibice

Při vzrůstající koncentraci substrátu vzrůstá i stupeň inhibice. ⁵ Akompetitivní inhibitory reagují až s komplexem ES. Vážou se na enzym, když přítomný substrát vhodně změni svoji konformaci a tím zabraňují vzniku produktu. Při tomto typu inhibice je zachován poměr mezi limitní rychlostí a Michaelisovou konstantou, protože dochází ke stejnému snížení obou veličin ($K'_M/K_M = V'/V$). ¹



Obrázek 7: Akompetitivní typ inhibice ⁵

2.9 Použité metody v experimentální části

2.9.1 α -amylasa

α -amylasa (1, 4- α -D-glukan-maltohydrolasa, E.C. 3.2.1.2) je enzym, který hydrolyticky štěpí 1, 4- α -D-glukosidové vazby škrobu a podobných sacharidů na maltosu.⁵

Amylasy se hojně využívají v technologické praxi v lihovarnictví a pivovarnictví. Výborným zdrojem je slad (naklíčený ječmen), ve kterém se vyskytují dvě různé amylasy, a to α -amylasa a β -amylasa. Jako u většiny rostlinných materiálů, tak i ve sladu nad α -amylasou převládá β -amylasa.⁹ Zelený slad, tedy naklíčená zrna ječmenu, je jedním z mezistupňů při výrobě sladu. Ječmen se nejprve máčí a pohlcuje vodu pro další fázi klíčení. To probíhá ve vrstvách na tzv. humnech, kde při teplotách 10 – 20 °C, zhruba během týdne dochází ke složitým enzymatickým změnám uvnitř zrn. Dalším stupněm je již zelený slad, který se dále suší od přítomné vody. Po očištění sladu od nečistot a klíčků se uskládňuje v silech pro další užití.¹⁰ Amylasy ze sladu byla prvním popsáním enzymem (viz kapitola 2.3).

V lidském těle započíná štěpení škrobu působením slinné amylasy již v ústech. Pokračuje v žaludku, pokud je k tomu vhodné pH. V žaludku se vlivem kyselého prostředí zastavuje účinek amylasy ze slin. Škrob se dále tráví působením pankreatické amylasy ve dvanácterníku, kde je ukončeno hydrolytickým rozštěpením na maltosu.⁷

2.9.1.1 *Izolace α -amylasy*

2.9.1.1.1 Ze slin

Tento enzym se dá jednoduše získat z vlastních slin. Vypláchnutím ústní dutiny destilovanou vodou a následným zfiltrování vzorku za normálního tlaku se získá roztok amylasy. Ten se může zředit vodou, aby nebyl příliš aktivní a mohlo se s ním pracovat.⁷

2.9.1.1.2 Ze zeleného sladu

Naklíčená ječná zrna se musí zhomogenizovat v mixéru. Rozemletá zrna se poté extrahují ve zředěném alkoholu a extrakt se přefiltruje za sníženého tlaku. Extrakce a filtrace se provádí ještě jednou. α -amylasa se ze spojených filtrátů vysráží přebytkem koncentrovaného alkoholu. Odstředěná, nebo zfiltrovaná sraženina se dvakrát suší v koncentrovaném alkoholu a jednou v diethyletheru.⁹

2.9.1.2 Měření aktivity

Aktivita tohoto enzymu se dá sledovat při reakci s jodem, jelikož substrát s ním dává modré zabarvení, kdežto výsledný produkt nikoliv. Zkumavka se zředěným roztokem enzymu se temperuje společně se zkumavkou obsahující roztok škrobu, chlorid sodný a fosfátový pufr 7,2. Po vytemperování všech složek se enzym přidá do druhé zkumavky. Po 3 – 4 minutách se nanáší několik kapek do roztoku jodu, kde se detekuje přítomnost škrobu. Reciproká (převrácená) hodnota času, během které dochází k úplnému rozštěpení škrobu, slouží jako míra aktivity enzymu. Tato aktivita je velmi závislá na koncentraci vodíkových iontů. Nejvýhodnější hodnotu pH, tzv. pH optimum, lze určit při provedení reakce v tlumivých roztocích (pufrech) o různém pH. ⁵

2.9.2 Peroxidasa

Enzym peroxidasa rozkládá peroxid vodíku. Ten se může tvořit během oxidačních reakcí působením oxidas. Peroxidasy ho, jako i jiné peroxidy, štěpí na aktivní kyslík a vodu. Peroxidasy katalyzují oxidaci látky, které předávají kyslík. Tento enzym je rozšířen více u rostlin než u živočichů. Peroxidasa má stejnou aktivitu v 1 – 5 ml extraktu 0,27 g krmné řepě, 0,54 g cukrovky, 0,72 g pšeničných otrub, 1,44 g pšeničné mouky. ⁷ Dále se peroxidasa vyskytuje například v bramborách.

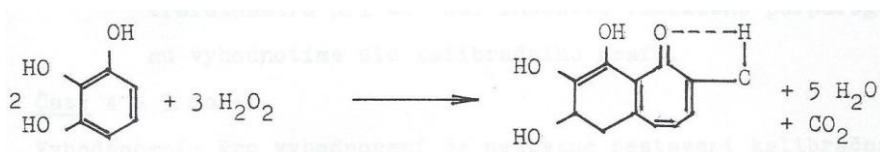
2.9.2.1 Izolace peroxidasy

Snadným postupem se dá tento enzym izolovat z křenu. Křenový kořen se po jeho očištění nastrouhá na struhadle. Nastrouhaný křen se louhuje v roztoku uhličitanu sodného a vzniklý extrakt se následně přefiltruje za normálního tlaku. ⁷

2.9.2.2 Měření aktivity

Aktivita tohoto enzymu se posuzuje v závislosti rychlosti oxidace pyrogallolu peroxidem vodíku na tvorbě žlutohnědého, těžko rozpustného barviva - purpurogallinu. Zkumavky, každá s jiným pH fosfátového pufru (7,0 a 7,1), se po přidání pyrogallolu a peroxidu vodíku do obou zkumavek temperují. Po přidání enzymu do zkumavek se vytemperují ještě jednou a reakce se zastaví přidáním destrukturu. V tomto případě

kyselinou sírovou, která denaturuje bílkovinnou část enzymu. Vznikající purpurogallin se vytřepe trojnásobnou extrakcí diethyletherem. ⁷



Obrázek 8: oxidace pyrogalolu peroxidem vodíku na purpurogallin ⁷

2.9.2.3 Vyhodnocení

Intenzita purpurogallinu, který je rozpustný v ethyletheru, se stanovuje spektrofotometricky při 467 nm a vyhodnotí se z kalibračního grafu. Ten je sestrojen z různě koncentrovaných vzorků dichromanu draselného měřených při vlnové délce 415 nm. Protože svojí intenzitou odpovídá určitému množství purpurogallinu. ⁷

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Během prováděných experimentů bylo využíváno běžného vybavení chemické laboratoře katedry chemie Fakulty pedagogické ZČU v Plzni. Chemikálie byly v běžných čistotách (čisté, nebo p. a.)

3.1 Závislost rychlosti štěpení škrobu α -amylasou na pH

3.1.1 Pomůcky

váhy, mixér, filtrační papír, nůžky, lžička, Erlenmeyerovy baňky (1x 200 ml, 1x 1000 ml), odměrné válce (2x 50 ml, 1x 100 ml, 1x 200 ml, 1x 500 ml), vývěva, odsávací baňka, Büchnerova nálevka, vyvažovací kuličky, kádinky (10x 250 ml), odstředivka, odstředivací zkumavky (kyvety), analytické váhy, tyčinka, nálevka, stojan, kruh, svorka, zkumavky, stříčka, termostatovaná lázeň, stojan na zkumavky, pipety (1x 5ml, 4x 2 ml), kapátka, kahan, trojnožka, sítko s azbestem, lednice, mrazák ⁵

3.1.2 Chemikálie

- 96% ethanol
- destilovaná voda
- diethylether
- 1% roztok škrobu
- 0,02 N roztok jodu
- 0,2 M roztok chloridu sodného
- 0,1 M fosfátové pufrы pH 6,0; 6,4; 6,8; 7,2; 7,6; 8,0 ⁵

3.1.3 Postup

3.1.3.1 Izolace α -amylasy ze sladu

- 100 g zeleného sladu bylo v mixéru zhomogenizováno a 10 minut extrahováno ve směsi 130 ml destilované vody a 50 ml ethanolu.

- Poté byl extrakt odsán na Büchnerově nálevce a extrakce i odsávání se opakovalo ještě jednou. (Pozor: Během odsávání se dno nálevky zalepovalo vznikajícími bílkovinami, proto byla vrstva velmi opatrně promíchávána lžičkou.)
- Spojené filtráty byly převedeny do 1 l Erlenmayerovy baňky a vysráženy 2,5 násobným množstvím 96% ethanolu (500 ml).
- Vzniklá sraženina byla odstředěna na odstředivce (Nejprve byly vyváženy 2 kádinky (250 ml) na vahách. Poté byly do kádinek umístěny protilehlé kyvety z odstředivky a přidán roztok se sraženinou tak, aby byly kyvety stejně těžké. Roztok byl odstřeďován 10 minut při otáčkách v rozmezí 1800 – 2000 otáček za minutu.)
- Sraženina byla kvantitativně převedena ze čtyř kyvet do jedné a čirý roztok nad sraženinou odlit.
- Sraženina byla sušena koncentrovaným ethanolem a diethyletherem a dosušena na vzduchu. (Sraženina byla rozmíchána ve 40 ml koncentrovaného ethanolu (asi 15 minut) a odstředěna stejným způsobem jako v předchozím případě. Sušení ethanolem bylo opakováno ještě jednou. Nakonec byla sraženina promíchána v diethyletheru a po 15 minutách odstředěna (Pozor: V odstředivce bylo dosaženo 2000 otáček. Poté byla vypnuta a nechala se samovolně dotočit, protože při opakovaném zapínání a vypínání by mohlo dojít k vytvoření jiskry a výbuchu hořlavých par diethyletheru.)⁹

3.1.3.2 Izolace α -amylasy ze slin

- Vzorek slin byl získán vypláchnutím úst 10 ml destilované vody po dobu 2 minut.
- Roztok slin s destilovanou vodou byl vypuštěn do kádinky a zfiltrován za normálního tlaku.
- Filtrát byl zředěn destilovanou vodou v poměru 1 : 5.⁷

3.1.3.3 Příprava 1% roztoku škrobu

- 1 g bramborového škrobu byl rozmíchán v 50 ml destilované vody.
- Nad kahanem bylo přivedeno k varu dalších 50 ml destilované vody.
- Ke vroucí vodě byla po malých dávkách a za stálého míchání přilévána suspenze škrobu a vody tak, aby voda stále vřela.

3.1.3.4 Závislost rychlosti štěpení škrobu α -amylasou ze slin na pH

- Slinný roztok byl zředěn destilovanou vodou v poměrech 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3.
- Do 3 zkumavek bylo napipetováno 5 ml roztoku škrobu, 2 ml roztoku chloridu sodného a 2 ml fosfátového pufru pH 7,2.
- Zkumavky byly vloženy do termostatované lázně na 37°C společně se zkumavkami obsahující zředěné roztoky enzymu a temperovány po dobu 10 minut.
- Po 10 minutách byly do zkumavek přidány 2 ml zředěného roztoku enzymu a obsah byl promíchán.
- Po 3 – 4 minutách bylo kapátkem odebráno pár kapek vzorku do zkumavek s roztokem jodu (2 kapky roztoku jodu ve 2 ml vody), při tvorbě méně tmavého roztoku škrobu s jodem se doba přidávání zkracovala.
- Byl určován čas potřebný na vymizení pozitivní reakce na škrob ve zkumavce (v přítomnosti jodu a škrobu se tvoří modrý roztok).
- Ideální zředění enzymu bylo takové, při kterém byla reakce ukončena do 10 minut.
- Pokud zředění vyhovovalo, bylo analogickým postupem určeno pH optimum pouze s tím rozdílem, že do zkumavek byl pipetován zředěný roztok enzymu a 6 různých pufrů.
- Reciproké hodnoty času byly naneseny do grafu proti hodnotě pH použitého pufru, získanými body byla proložena křivka a z ní odečteno pH optimum.⁵

3.1.3.5 Závislost rychlosti štěpení škrobu α -amylasou ze sladu na pH

- Na analytických vahách bylo naváženo 100 mg vzorku.
- Vzorek byl ve zkumavce rozmělněn na co možná nejmenší částičky a rozpuštěn ve 3 ml destilované vody.
- Do zkumavky bylo napipetováno 5 ml roztoku škrobu, 2 ml roztoku chloridu sodného a 2 ml fosfátového pufru pH 7,2.
- Zkumavka byla vložena do termostatované lázně na 37°C společně se zkumavkou obsahující roztok enzymu a temperována po dobu 10 minut.
- Po 10 minutách byly do zkumavky přidány 2 ml roztoku enzymu a obsah byl promíchán.

- Po 3 – 4 minutách bylo kapátkem odebráno pár kapek vzorku do zkumavek s roztokem jodu (2 kapky roztoku jodu ve 2 ml vody), při tvorbě méně tmavého roztoku škrobu s jodem se doba přidávání zkracovala.
- Byl určován čas potřebný na vymizení pozitivní reakce na škrob ve zkumavce (v přítomnosti jodu a škrobu se tvoří modrý roztok).
- Dané zředění enzymu (100 mg ve 3 ml vody) bylo vhodné, při ukončení reakce do 10 minut.
- Pokud zředění vyhovovalo, bylo analogickým postupem určeno pH optima pouze s tím rozdílem, že do zkumavek byl pipetován zředěný roztok enzymu a 6 různých pufrů.
- Reciproké hodnoty času byly naneseny do grafu proti hodnotě pH použitého pufru, získanými body byla proložena křivka a z ní odečteno pH optimum.⁵

3.1.4 Výsledky

3.1.4.1 Extrakt ze zeleného sladu

3.1.4.1.1 Extrakt 1

1. pokus – Bylo zvoleno zředění 100 mg ve 3 ml H₂O a byl připraven nový roztok škrobu. Reakce nebyla ukončena ani po 13 minutách (roztok byl málo koncentrovaný).

3.1.4.1.2 Extrakt 2

1. pokus - Bylo zvoleno zředění 100 mg ve 3 ml H₂O. Pozitivní reakce na škrob ve zkumavce nevymizela do 10 minut (roztok byl málo koncentrovaný).

3.1.4.1.3 Extrakt 3

Pokus nemohl být proveden, neboť byl znehodnocen uschovaný vzorek ve zkumavce.

3.1.4.1.4 Extrakt 4

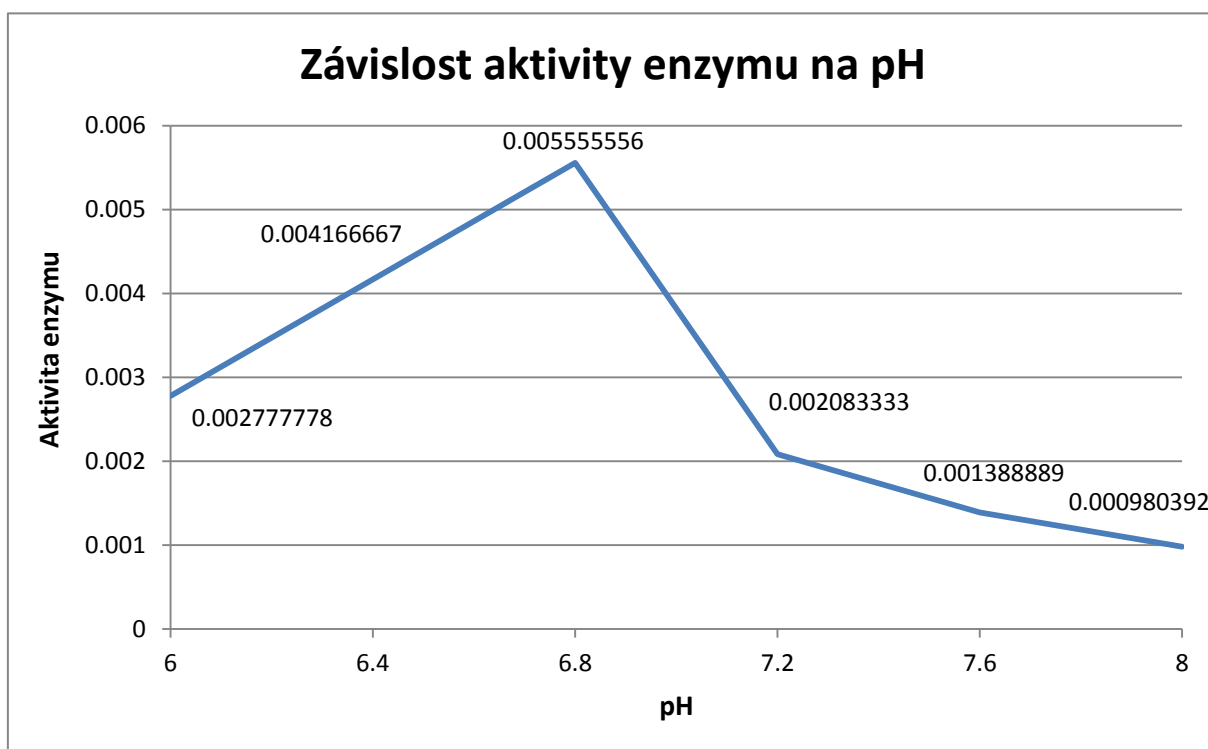
1. pokus – Pozitivní reakce na škrob vymizela po 8 minutách. Tudiž bylo takto zvolené zředění (100 mg ve 3 ml H₂O) použito pro stanovení pH optima.

2. pokus – Zbytek sraženiny, tedy 0,2818 g, byl rozpuštěn v 10 ml H₂O, což zhruba odpovídalo zředění z 1. pokusu.

Tabulka 2: čas potřebný k vymizení pozitivní reakce na škrob v závislosti na pH, aktivita enzymu

pH pufru	čas potřebný k ukončení reakce	Aktivita (reciproké hodnoty času)
6,0	360 sekund	0,002777778
6,4	240 sekund	0,004166667
6,8	180 sekund	0,005555556
7,2	480 sekund	0,002083333
7,6	710 sekund	0,001388889
8,0	1020 sekund	0,000980392

Graf 1: Závislost aktivity enzymu na pH, určení pH optima



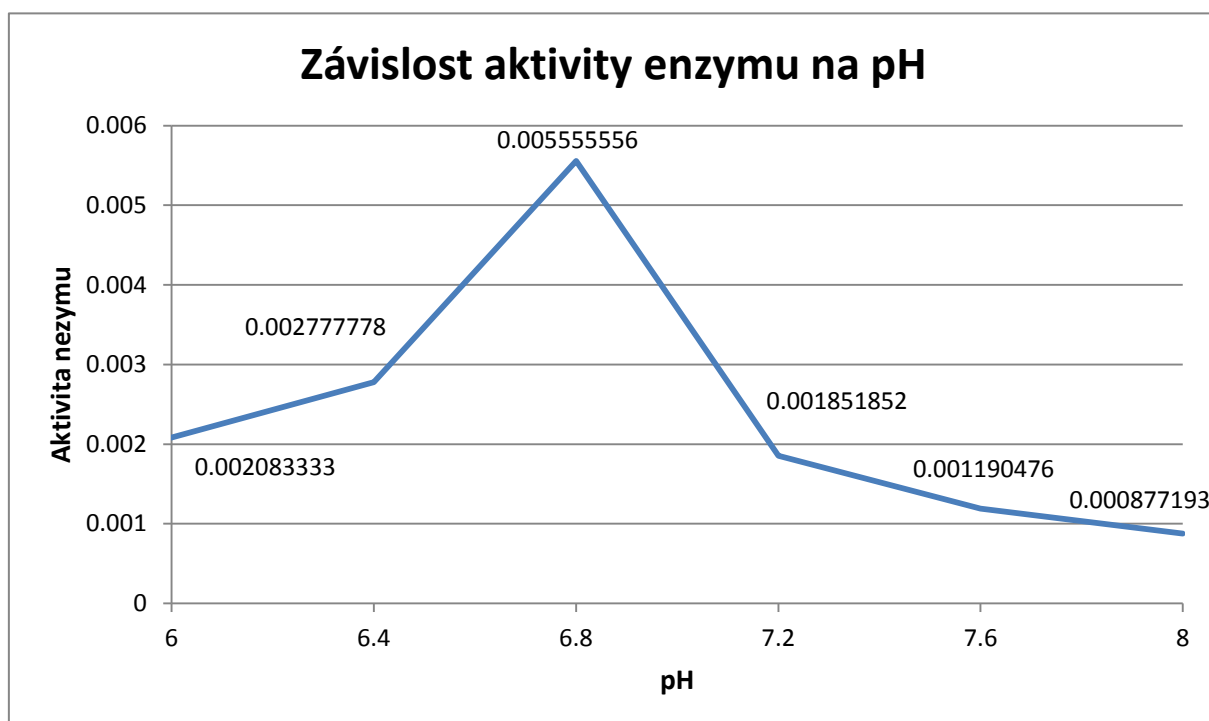
3.1.4.1.5 Extrakt 5

1. Pokus – Zředění 100 mg ve 3 ml H₂O nebylo vyhovující, protože vzorek byl příliš koncentrovaný a reakce byla ukončena již do 3 minut.
2. pokus – V důsledku množství zbylého extraktu bylo zvoleno zředění 100 mg v 12 ml H₂O. Pozitivní reakce na škrob vymizela po 9 minutách.

Tabulka 3: čas potřebný k vymizení pozitivní reakce na škrob v závislosti na pH, aktivita enzymu

pH pufru	čas potřebný k ukončení reakce	Aktivita (reciproké hodnoty času)
6,0	480 sekund	0,002083333
6,4	360 sekund	0,002777778
6,8	180 sekund	0,005555556
7,2	540 sekund	0,001851852
7,6	840 sekund	0,001190476
8,0	1140 sekund	0,000877193

Graf 2: Závislost aktivity enzymu na pH, určení pH optima

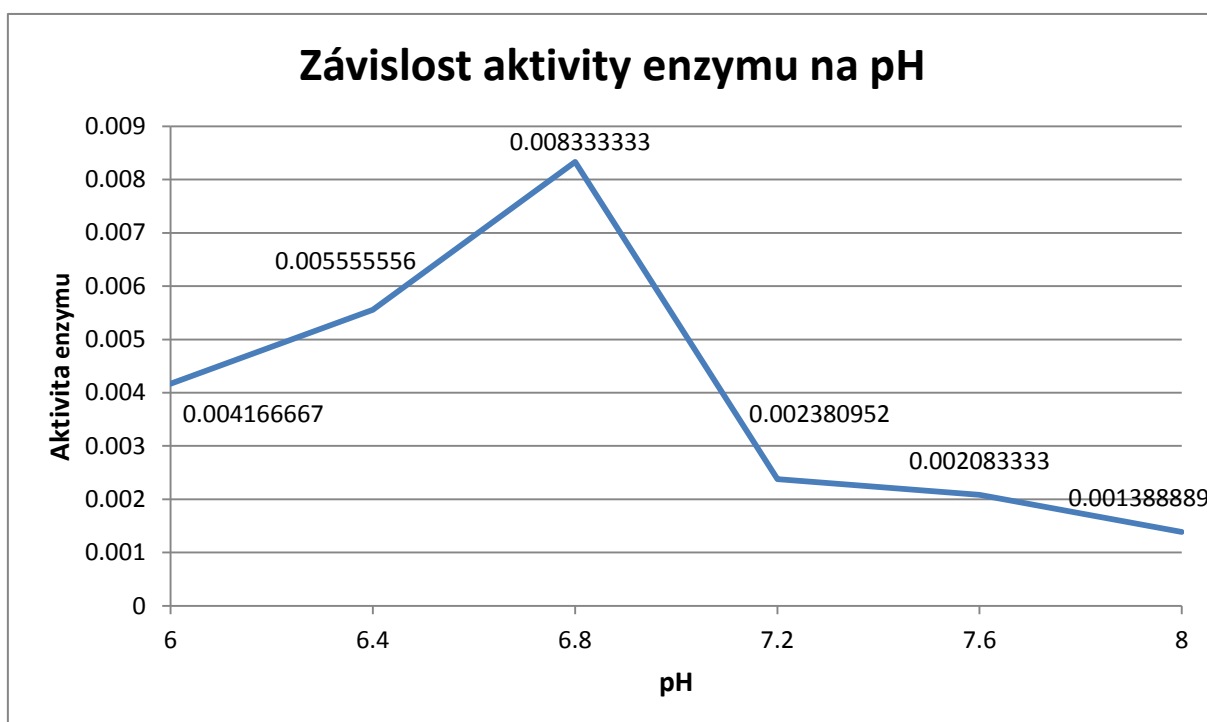


3. pokus – Vzorek byl uložen zhruba měsíc ve tmě při laboratorní teplotě. Pozitivní reakce vymizela po 7 minutách při zředění 100 mg ve 12 ml H₂O.

Tabulka 4: čas potřebný k vymizení pozitivní reakce na škrob v závislosti na pH, aktivita enzymu

pH pufru	čas potřebný k ukončení reakce	Aktivita (reciproké hodnoty času)
6,0	240 sekund	0,004166667
6,4	180 sekund	0,005555556
6,8	120 sekund	0,008333333
7,2	420 sekund	0,002380952
7,6	480 sekund	0,002083333
8,0	720 sekund	0,001388889

Graf 3: Závislost aktivity enzymu na pH, určení pH optima

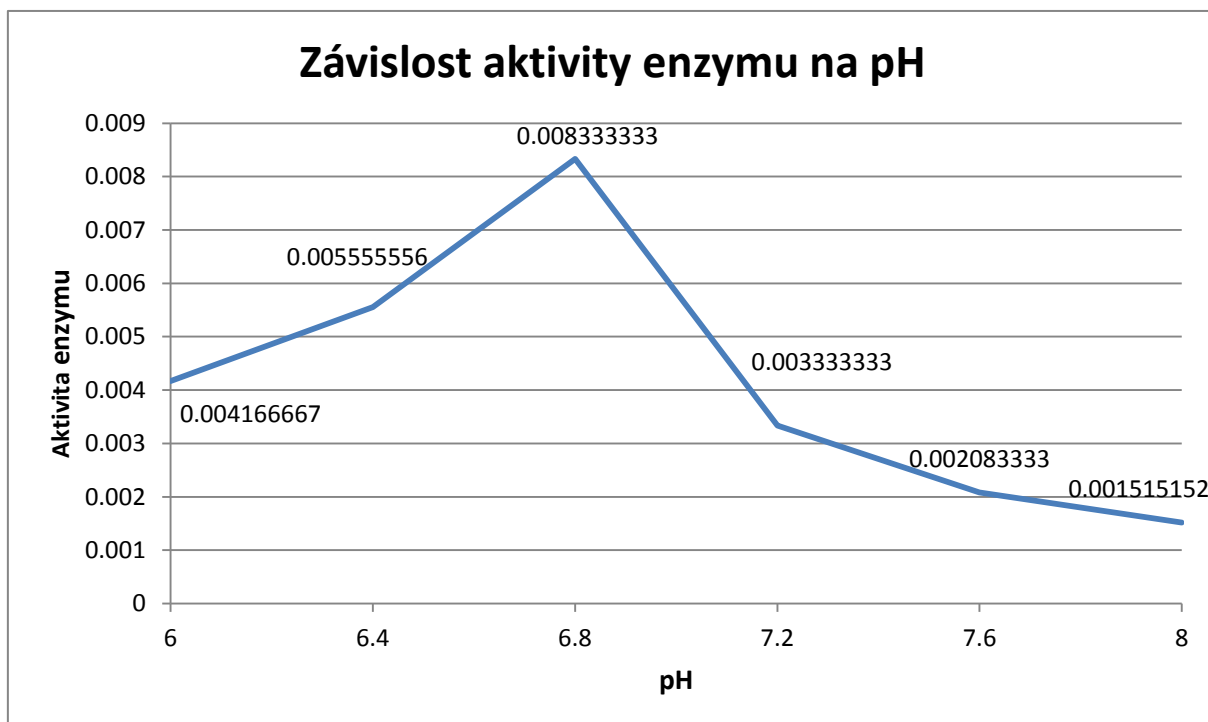


4. pokus – Vzorek byl měsíc uložen v lednici. Pozitivní reakce vymizela po 5 minutách při zředění 100 mg ve 12 ml H₂O.

Tabulka 5: čas potřebný k vymizení pozitivní reakce na škrob v závislosti na pH, aktivita enzymu

pH pufru	čas potřebný k ukončení reakce	Aktivita (reciproké hodnoty času)
6,0	240 sekund	0,004166667
6,4	180 sekund	0,005555556
6,8	120 sekund	0,008333333
7,2	300 sekund	0,003333333
7,6	480 sekund	0,002083333
8,0	660 sekund	0,001515152

Graf 4: Závislost aktivity enzymu na pH, určení pH optima

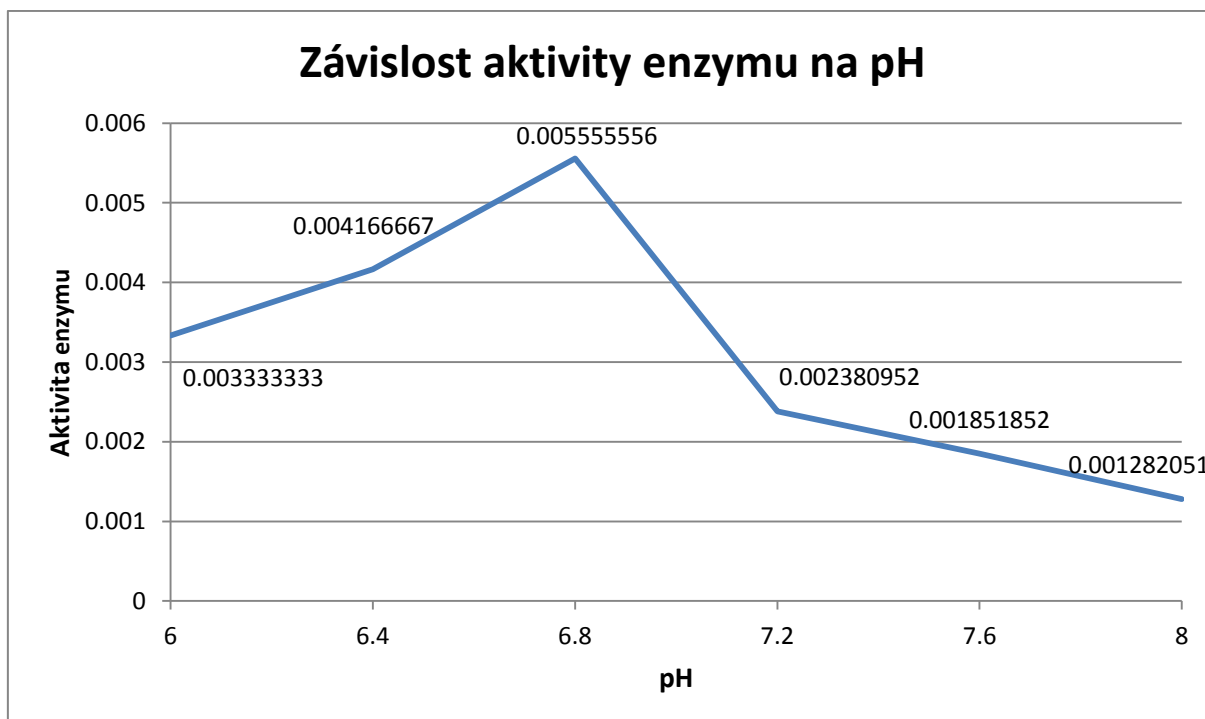


5. pokus - Vzorek byl měsíc uložen v mrazáku. Pozitivní reakce vymizela po 7 minutách při zředění 100 mg ve 12 ml H₂O.

Tabulka 6: čas potřebný k vymizení pozitivní reakce na škrob v závislosti na pH, aktivita enzymu

pH pufru	čas potřebný k ukončení reakce	Aktivita (reciproké hodnoty času)
6,0	300 sekund	0,003333333
6,4	240 sekund	0,004166667
6,8	180 sekund	0,005555556
7,2	420 sekund	0,002380952
7,6	540 sekund	0,001851852
8,0	780 sekund	0,001282051

Graf 5: Závislost aktivity enzymu na pH, určení pH optima



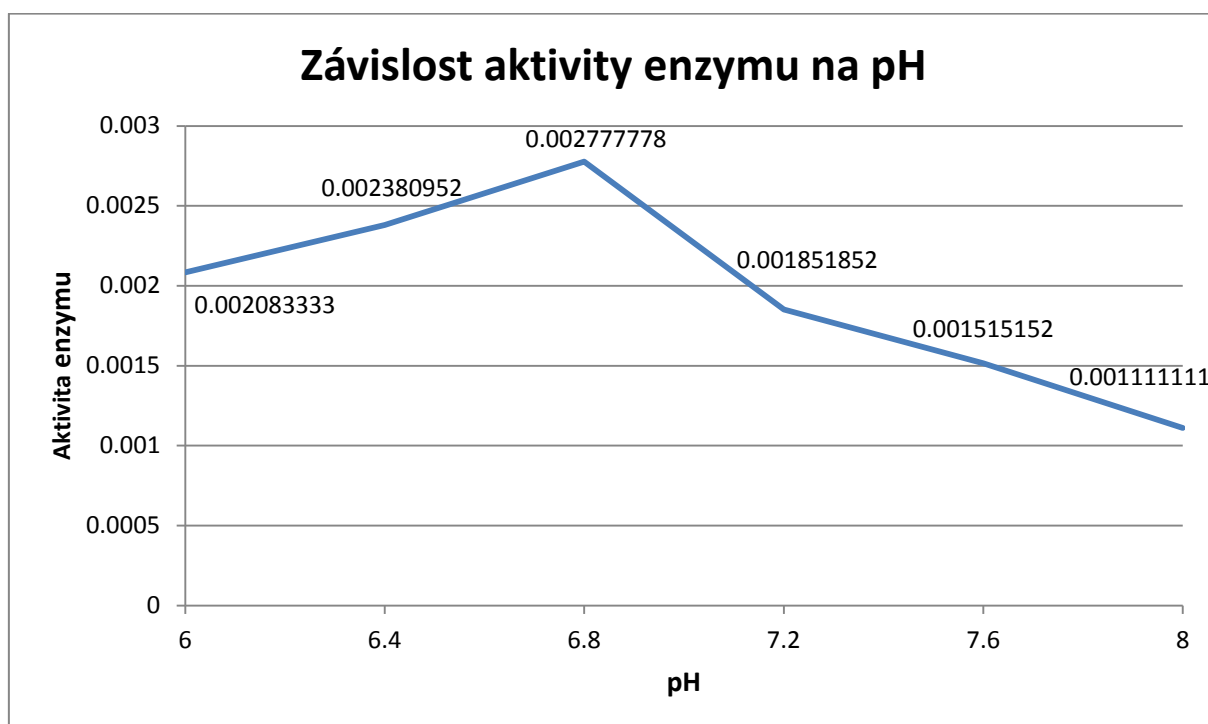
3.1.4.2 Slinný extrakt

1. pokus – Pozitivní reakce na škrob vymizela po 9 minutách při zředění 1 : 1.

Tabulka 7: čas potřebný k vymizení pozitivní reakce na škrob v závislosti na pH, aktivita enzymu

pH pufru	čas potřebný k ukončení reakce	Aktivita (reciproké hodnoty času)
6,0	480 sekund	0,002083333
6,4	420 sekund	0,002380952
6,8	360 sekund	0,002777778
7,2	540 sekund	0,001851852
7,6	660 sekund	0,001515152
8,0	900 sekund	0,001111111

Graf 6: čas potřebný k vymizení pozitivní reakce na škrob v závislosti na pH, aktivita enzymu



3.1.5 Závěr

Byla sledována měnící se aktivita α -amylasy ze zeleného sladu během postupující doby klíčení a různého typu uskladnění a aktivita α -amylasy extrahované ze slin.

Zelený slad z Plzeňského Prazdroje (naklíčený ječmen) byl uskladňován dle jejich doporučení: Při teplotě nižší, než je laboratorní teplota a po celou dobu byl lehce nakropený vodou.

1. extrakt byl v jeden den připraven do fáze před odsáváním a srážením. Rozemletý slad byl ve směsi 50 ml ethanolu a 130 ml destilované vody extrahován tři dny. Po třech dnech byl extrakt odsán za sníženého tlaku a vysrážen. Vzniklá sraženina měla hmotnost 0,3873 g. Při pokusu na její aktivitu, však pozitivní reakce na škrob nevymizela ani po 13 minutách.

2. extrakt byl v jeden den připraven až do fáze srážení a následně uschován ve tmě při laboratorní teplotě. Následující den byla sraženina vysušena a změřena její aktivita na štěpení 1, 4- α -D-glukosidové vazby škrobu. Tato reakce však nebyla ukončena do 10 minut. Hmotnost vzniklé sraženiny byla 0,5528 g.

3. extrakt nemohl být použit. Vzorek byl totiž umístěn do horké zkumavky a při uskladnění v ní zkondenzovala voda, která vzorek znehodnotila.

4. extrakt byl připraven stejným způsobem jako 2. extrakt. V jeden den byla dosažena fáze srážení, a po uskladnění ve tmě a za laboratorní teploty, byla sraženina další den dodělána. Vzniklá sraženina měla hmotnost 0,3904 g. Při zředění 100 mg vzorku ve 3 ml vody byla reakce ukončena do 8 minut. Proto bylo toto zředění použito k měření aktivity při různých pH (tabulka 2) a tudíž k určení pH optima (graf 1).

5. extrakt byl v jeden den připraven ke srážení a po třech dnech byla vzniklá sraženina odstředěna a vysušena. Hmotnost sraženiny byla 0,7883 g. Při pokusu na aktivitu α -amylasy byl vzorek při zředění 100 mg ve 3 ml H₂O moc koncentrovaný a reakce byla ukončena do 3 minut. Proto bylo zvoleno zředění 100 mg vzorku ve 12 ml H₂O a pozitivní reakce na škrob vymizela za 9 minut. (tabulka 3) S takovýmto zředěním bylo

zjišťováno pH optimum (graf 2). Zbytek vzorku byl rozdělen na 3 stejné díly a zhruba na měsíc uschován za různých podmínek (ve tmě za laboratorní teploty, v lednici a v mrazáku). Po měsíci byly provedeny pokusy na zjištění přítomnosti α -amylasy a její aktivitu při různých pH. U všech vzorků bylo zvoleno zředění 100 mg ve 12 ml H₂O. Pozitivní reakce u všech vzorků při použití pufru o pH 7,2 vymizela do 10 minut (tabulky 4, 5, 6). Následně byly provedeny pokusy na zjištění pH optima (grafy 3,4,5).

Bylo zjištěno, že se aktivita α -amylasy mění s rostoucí dobou klíčení, jak dokazuje rozdíl aktivit mezi 4. extraktem a 1. pokusem u 5. extraktu, kdy se zvyšuje aktivita po delší době klíčení, protože při stejném zředění byla reakce u 5. extraktu ukončena již do 3 minut. Míra aktivity α -amylasy z 5. extraktu se však při uschování za různých podmínek razantně změnila. Nezáleželo tolik na místě uskladnění, ale na jeho době. Rozdíly mezi aktivitami amylas uskladněných ve tmě, v lednici a mrazáku sice byly, ale nijak velké. Při porovnání hodnot naměřených při pH 6,8 (pH optimum) bylo dokonce zjištěno, že u vzorků uskladněných při laboratorní teplotě a v lednici se na rozdíl od amylasy uskladněné v mrazáku aktivita ještě zvýšila. To znamená, že je možno amylasu připravovat do zásoby.

Možnou změnu vlastností sladu během doby klíčení bylo možno sledovat i při odsávání extraktu na Büchnerově nálevce, protože doba odsávání se rapidně snižovala s rostoucí dobou klíčení (o více než hodinu). Během pokusů jsme byli limitováni množstvím vzniklé sraženiny, protože návod ke zjištění závislosti rychlosti štěpení škrobu α -amylasou na pH byla použita z jiné literatury, než návod pro extrakci α -amylasy ze sladu.

Jako další zdroj α -amylasy byly zvoleny sliny. Postupovalo se dle stejného návodu jako při pokusu se zeleným sladem na určení aktivity enzymu. Vymizení pozitivní reakce na škrob proběhlo za 9 minut, při zředění slinného roztoku 1 : 1. Tento poměr se může lišit u každého člověka, kvůli odlišnému složení a typu slin.

Aktivita α -amylasy extrahované ze slin byla nižší v kyselé oblasti pH oproti aktivitě α -amylasy ze zeleného sladu. V bazickém prostředí se rozdíl aktivit mezi amylasou ze slin a sladu snižoval a u pH 8 vykazovala i vyšší aktivitu.

Vzniklé 1 – 2 minutové rozdíly mohly být způsobeny při určování zabarvení roztoku, nebo kvůli ukončení reakce mezi dvěma měřeními. Z pokusů na zjištění pH optima byla u všech vzorků naměřena hodnota optimálního pH 6,8.

3.2 Stanovení aktivity peroxidasy

3.2.1 Pomůcky

vodní lázeň, struhadlo, dělicí nálevky (2x 250 ml), 2 kruhy, 2 stojany, spektrofotometr, filtrační papír, nůžky, lžička, váhy, nůž, analytické váhy, vývěva, odsávací baňka, Büchnerova nálevka, odměrné válce (1x 50 ml, 1x 100 ml, 1x 1000 ml), Erlenmayerovy baňky (3x 250 ml), destilovaná voda, stříčka, kyvety, odměrná baňka (1x 1000ml), pipety dělené (2x 10 ml, 3x 1 ml, 1x 5 ml) ⁷

3.2.2 Chemikálie

- diethylether
- fosfátový pufr pH 7,0 a 7,1
- peroxid vodíku ($c = 0,2 \text{ mol/dm}^3$)
- pyrogalol resublimovaný
- extrakt z kořene křenu
- 20% H_2SO_4
- roztok $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
- NaH_2PO_4
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$
- 0,05% roztok Na_2CO_3
- HCl ($c = 0,2 \text{ mol/dm}^3$) ⁷

3.2.3 Postup

3.2.3.1 Příprava roztoků

- Roztoky na přípravu fosfátových pufrů - roztok A = 27,8 g NaH_2PO_4 v 1000 ml destilované vody a roztok B = 71,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ v 1000 ml destilované vody.

- Fosfátové pufrů:

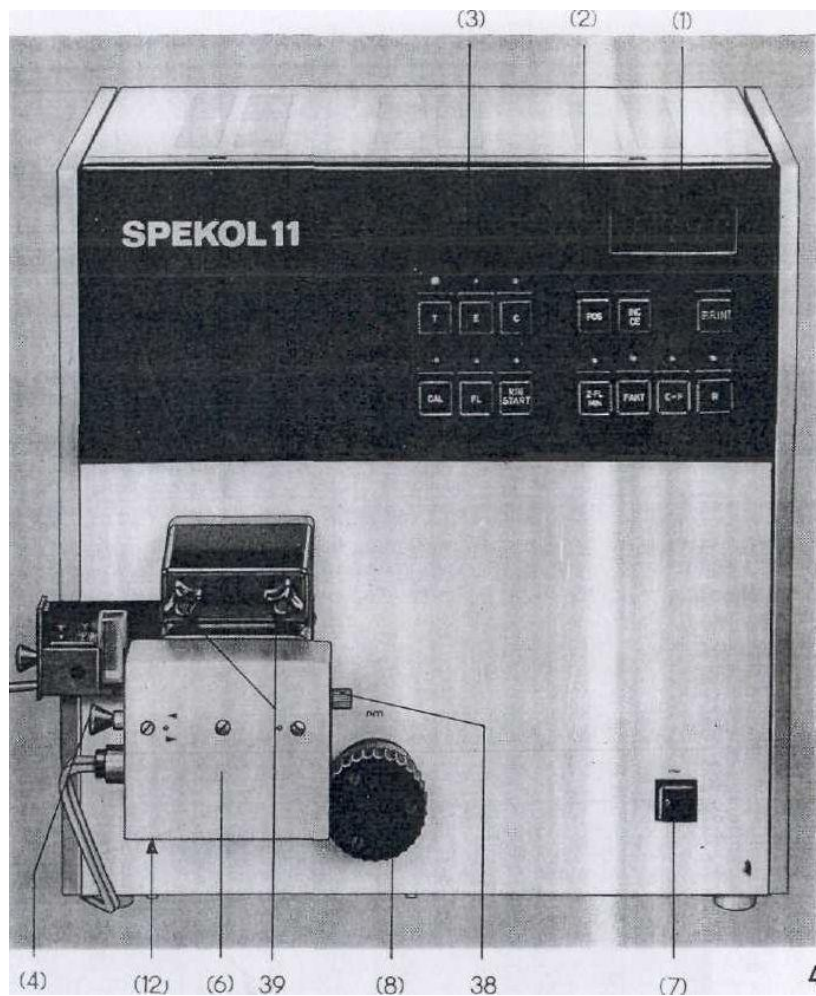
Tabulka 8: příprava fosfátových pufrů

pH pufru	roztok A (ml)	roztok B (ml)
7,0	39	61
7,1	33	67

- pyrogallol - 1,25 g pyrogallolu (o vhodné čistotě) bylo rozpuštěno ve 25 ml H₂O.
- 0,05% roztok Na₂CO₃ - 0,05 g Na₂CO₃ bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody.
- Extrakt z kořene křenu – křen byl důkladně očištěn a nastrouhán na struhadle, 100 g křenu bylo 1 hodinu louhováno ve 100 ml 0,05% roztoku Na₂CO₃ a následně odsán na Büchnerově nálevce. Byly připraveny 2 křenové extrakty. Aktivita prvního extraktu byla měřena po třech dnech od jeho přípravy a aktivita druhého extraktu byla měřena ve stejný den, kdy byl extrakt připraven.
- Roztok K₂Cr₂O₇ – 0,75 g K₂Cr₂O₇ bylo rozpuštěno v 1000 ml HCl (c = 0,2 mol/dm³).⁷

3.2.3.2 Obsluha spektrofotometru SPEKOL 11

- Spektrofotometr byl zapojen do sítě a zapnut tlačítkem ON (7, obrázek 9).
- Stisknutím tlačítka E (obrázek 9) byl přístroj nastaven na měření absorbance (extinkce) a zasunutím tyčinky (4, obrázek 9) byla nastavena vlnová délka měření nižší než 600 nm.
- Na bubínku (8, obrázek 9) byla nastavena požadovaná vlnová délka.
- Jedna kyveta byla naplněna destilovanou vodou, jakožto slepý vzorek a druhá byla naplněna sledovaným vzorkem.
- Kyvety byly naplněné zhruba do 3/4 objemu, protože v polovině kyvety procházel analyzující paprsek a dotýkalo se jich pouze na matných stranách.
- Před každým měřením byly nematné strany kyvety vyleštěny čistým hadříkem a kyvety vypláchnuty nejprve destilovanou vodou a následně vzorkem.
- Přístroj byl vykalibrován tlačítkem R (obrázek 9) na slepém vzorku.⁷



Obrázek 9: Spektrofotometr SPEKOL 11 (převzato z cit. ¹¹)

- 1 – indikační okénko
- 2 – klávesnice ukládání údajů
- 3 – klávesnice „způsob měření“
- 4 – rukojeť pro zasunutí fotonky do dráhy paprsků
- 6 – kryt fotonky
- 7 – síťový vypínač
- 8 – bubínek vlnových délek
- 12 – páka pro natočení filtru rozptýleného světla nebo dodatečné clony
- 38 – šroub s rýhovanou hlavou pro upevnění krytu fotonky
- 39 – šrouby pro upevnění měřící násady ¹¹

3.2.3.3 Sestavení kalibračního grafu

- Při vlnové délce 415 nm, byla měřena absorbance různě koncentrovaných vzorků.
- Nejprve byla změřena absorbance připraveného roztoku $K_2Cr_2O_7$ dle návodu.
- Tento vzorek byl následně zředěn dvojnásobným množstvím destilované vody a změřen.
- Dvojnásobně zředěný roztok vzorku byl opět zředěn destilovanou vodou 1 : 1 a byla změřena intenzita zbarvení.
- Analogicky byly naředěny ještě 2 vzorky, a z 5 naměřených hodnot absorbance byl sestaven kalibrační graf 7 (cit. ⁷).

3.2.3.4 Měření aktivity peroxidasy

- Do zkumavky č. 1 bylo napipetováno 7,2 ml fosfátového pufru o pH 7,0.
- Do zkumavky č. 2 bylo napipetováno 7,2 ml fosfátového pufru o pH 7,1.
- Do obou zkumavek bylo přidáno 0,9 ml roztoku pyrogallolu o vhodné čistotě a 0,6 ml peroxidu vodíku.
- Zkumavky byly vloženy do vodní lázně vyhřáté na 20°C a temperovány po dobu 10 minut.
- Po 10 minutách bylo do obou zkumavek přidáno 0,3 ml vyextrahovaného enzymu z křenového kořene a vzorky byly opět inkubovány 10 minut ve vodní lázni.
- Reakce byla zastavena přidáním 5 ml 20% H_2SO_4 a purpurogallin ihned vytřepán do diethyletheru trojnásobnou extrakcí 20, 10 a 10 ml. (Pozor: Třepali jsme obrácenou děličkou s otevřeným kohoutem, neboť při třepání se dělička tlakovala vznikajícím plynem.)
- Kapaliny byly nemísitelné a diethylether se po rozsazení kapalin držel ve svrchní části roztoku. Proto byla spodní část odpuštěna do kádinky a svrchní do odměrného válce. Poté byla spodní část nalita zpět do dělicí nálevky a pokračovalo se ve vytřepávání.
- Objem spojených extraktů byl upraven diethyletherem na 40 ml.
- Při vlnové délce 467 nm byla změřena intenzita zbarvení na spektrofotometru.
- Množství vzniklého purpurogallinu bylo vyhodnoceno dle kalibračního grafu 8 (cit. ⁷).

3.2.4 Vyhodnocení

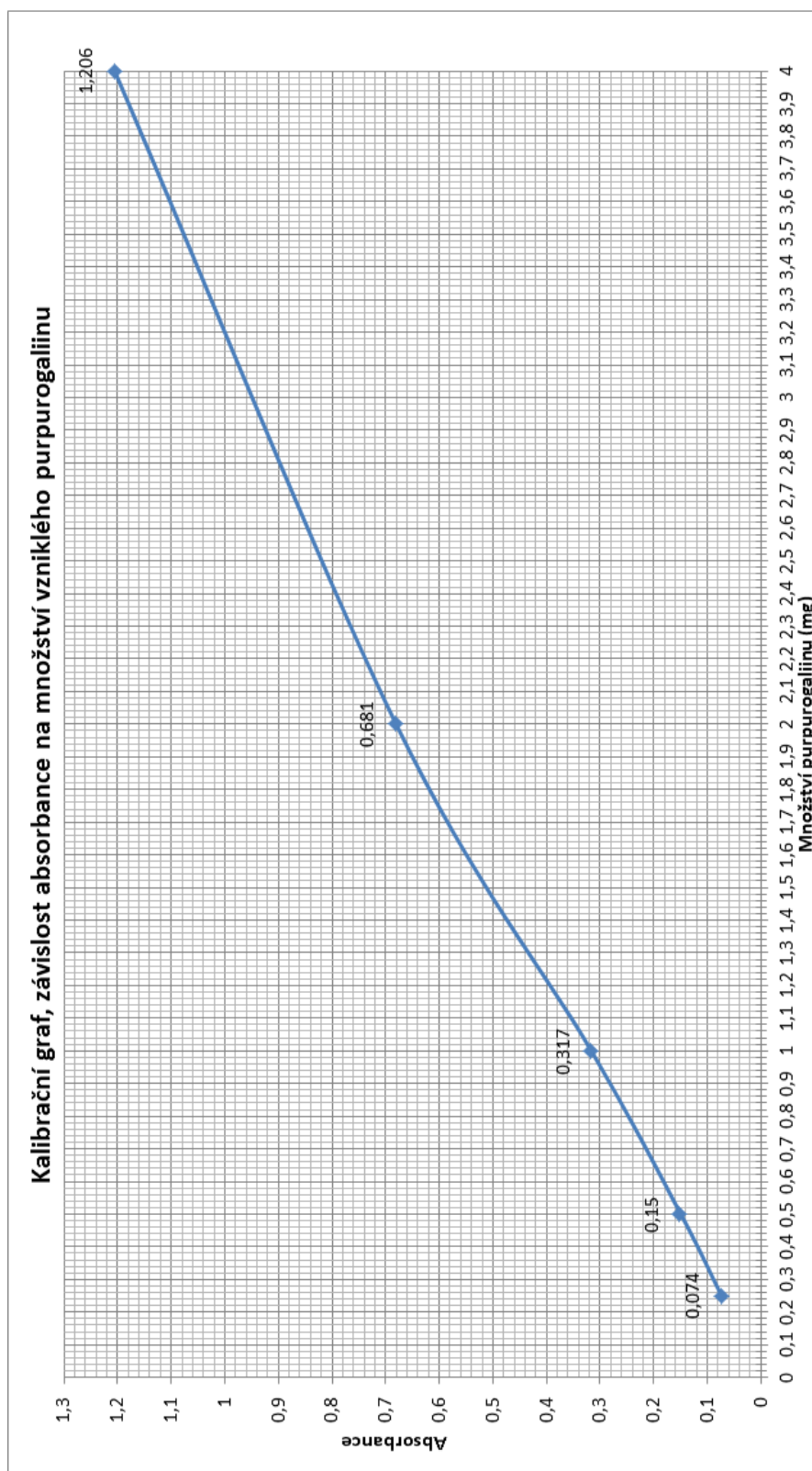
Pro vyhodnocení bylo nezbytné sestavení kalibračního grafu. Ten byl sestaven z výsledků měření intenzity zbarvení činidla $K_2Cr_2O_7$. Množství vzniklého purpurogallinu bylo stanoveno dle následujícího doporučení: 4 mg purpurogallinu rozpuštěného ve 40 ml ethyletheru svou intenzitou odpovídalo roztoku 0,75 g dichromanu draselného rozpuštěného v 1000 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci $0,2 \text{ mol/dm}^3$ atd. Intenzita činidla $K_2Cr_2O_7$ byla měřena při 415 nm. Aktivita enzymu byla vyjádřena v mg vzniklého purpurogallinu na 1 g křenového kořene.⁷

Tabulka 9: Naměřené hodnoty intenzity zbarvení pro tvorbu kalibračního grafu

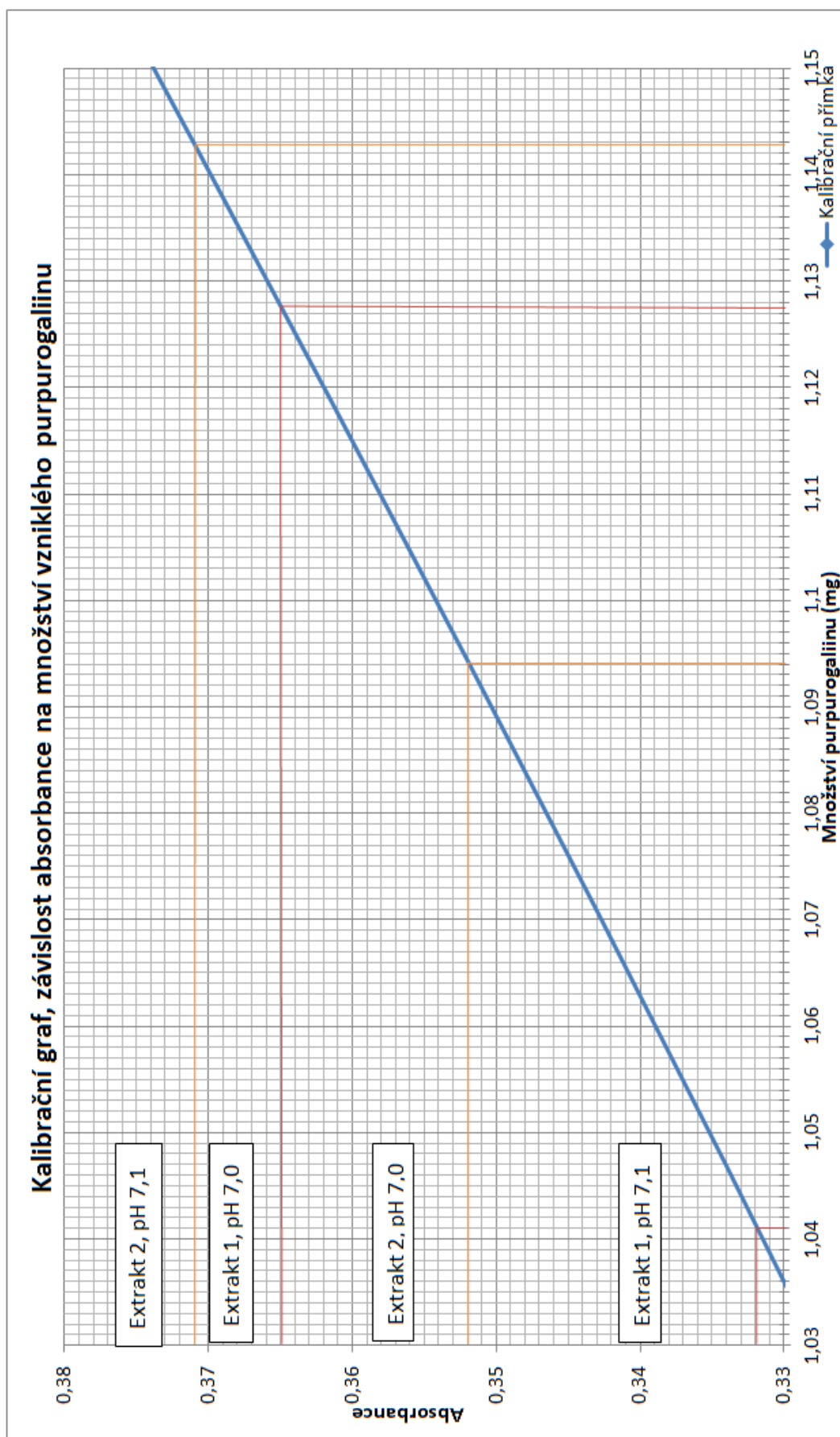
Absorbance	Množství purpurogallinu (mg)
1,206	4
0,681	2
0,317	1
0,15	0,5
0,074	0,25

3.2.4.1 Kalibrační graf

Graf 7: Kalibrační graf



Graf 8: Kalibrační graf v okolí výsledných hodnot aktivity enzymu



3.2.5 Výsledky

3.2.5.1 1. extrakt

Tabulka 10: naměřené absorbance a množství vzniklého purpurogallinu při různých pH

pH pufru	Absorbance	Množství purpurogallinu (mg/100 g)
7,0	0,365	1,1275
7,1	0,332	1,041

100 g křenové kořene ... 1,1275 mg purpurogallinu

1 g křenové kořene ... x mg purpurogallinu

$$x = \frac{1,1275 \cdot 1}{100} = 1,1275 \cdot 10^{-2} \text{ mg/g}$$

1,041 mg purpurogallinu = $1,041 \cdot 10^{-2}$ mg/g křenového kořene

3.2.5.2 2. extrakt

Tabulka 11: naměřené absorbance a množství vzniklého purpurogallinu při různých pH

pH pufru	Absorbance	Množství purpurogallinu (mg/100 g)
7,0	0,352	1,094
7,1	0,371	1,1427

1,094 mg purpurogallinu = $1,094 \cdot 10^{-2}$ mg/g křenového kořene

1,1427 mg purpurogallinu = $1,1427 \cdot 10^{-2}$ mg/g křenového kořene

3.2.6 Závěr

Z tabulky 10 a 11 je patrné, že čerstvě připravený a změřený křenový extrakt vykazoval odlišnou absorbanci oproti 3 dny uschovanému extraktu. Z kalibračního grafu (graf 8) se vyčetlo množství vzniklého purpurogallinu. Čerstvě připravený extrakt vykazoval při pH 7,0 nižší aktivitu o $0,335 \cdot 10^{-2}$ mg purpurogallinu na 1 g křenového kořene než uskladněný extrakt. Kdežto při pH 7,1 byl enzym aktivnější o $0,1017 \cdot 10^{-2}$ mg/g. Z toho plyne, že při uskladnění extraktu dochází ke změně jeho enzymové aktivity při různých pH.

4 ZÁVĚR

V práci byla připravena amylasa z klíčících zrn ječmene izolací v různých etapách klíčení. Amylasy získaná po dvanácti dnech klíčení (viz kapitola 3.1.4.1.5) byla rozdělena na část pro okamžité změření její aktivity (tabulka 3) a zbytek byl rozdělen na tři stejné části k uskladnění za různých podmínek po dobu 1 měsíce. Část byla uskladněna ve tmě za laboratorní teploty, druhá část v lednici a třetí část v mrazáku. Porovnáním aktivit jednotlivých uskladněných podílů (tabulky 4, 5, 6) bylo zjištěno, že malé rozdíly v aktivitách vzorků jsou, ale nejedná se o hodnoty nijak velké. Při porovnání hodnot naměřených při pH 6,8 (pH optimum) bylo dokonce zjištěno, že u vzorků uskladněných při laboratorní teplotě a v lednici se na rozdíl od amylasy uskladněné v mrazáku aktivita ještě zvýšila. To znamená, že je možno amylasu připravovat do zásoby.

Porovnáním aktivit α -amylas během postupující doby klíčení bylo zjištěno, že se jejich aktivita v čase mění, jak dokazuje rozdíl aktivit mezi 4. extraktem a 1. pokusem u 5. extraktu. Při stejném zředění byla totiž reakce u 5. extraktu ukončena již do 3 minut, kdežto u 4. extraktu až po 8 minutách při pH 7,2.

Dále byla porovnávána aktivita amylasy z ječmenného zrna s aktivitou slinné amylasy. Zde bylo zjištěno, že aktivita amylasy extrahované ze slin (tabulka 7) byla nižší v kyselé oblasti pH oproti aktivitě amylasy ze sladu (tabulky 2, 3), avšak v bazickém prostředí vykazovala slinná amylasa vyšší míru aktivity.

Při provedení všech pokusů na aktivitu α -amylasy byly rovněž provedeny pokusy na zjištění pH optima. Výsledky měření aktivit při různých pH vynesem do grafu vykreslily zvonkovitou křivku. Z grafů pH optima byly stanoveny hodnoty pH na pH 6,8.

V další části práce byla věnována pozornost využití peroxidasy izolované z kořene křenu. Pokusy bylo zjištěno, že aktivita tohoto enzymu se při uskladnění mění (viz tabulka 10 a 11), a proto by bylo lépe zpracovávat vždy extrakt nepříliš dlouho připravený

5 RESUMÉ

This work - through modification of tests - offers expansion of experiments in a basic exercise in biochemistry. It deals mainly with the use of α - amylase from various sources, such as green malt and human saliva. Because amylase is obtained before carrying out the enzymatic reactions, this work explores the possibility of preparing extracts in stock. Also, the work studies the changing activity of green malt amylase at various stages of germination and the difference between the salivary amylase activity and the activity of amylase from barley grain. The work also deals with the possibility of preparing an extract of the enzyme peroxidase in stock for another use. A part of this work is also a fundamental view on the issue of enzymatic reactions reported in the literature.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Vodrážka, Z.: *Biochemie 1*. Praha: Československá akademie věd, 1992. ISBN 80-200-0438-6.
2. Voet, D., Voetová, J. G.: *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-44-9.
3. Enzymologie: Kofaktory. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Enzymologie* [online]. [cit. 2014-06-24]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~spiwokv/enzymologie/kofaktory.pdf>
4. Biologie: Základní funkce buňky. *Antirux z Lep* [online]. 2005 [cit. 2014-06-24]. Dostupné z: <http://lep.wz.cz/skola/index.php?s=3&z=14>
5. Barthová, J., Sofrová, D., Tichá, M.: *Základní praktikum z biochemie*. Praha: Univerzita Karlova, 1980.
6. Fukal, L.: *Laboratorní cvičení z biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1996. ISBN 8070802618.
7. Pešová, M.: *Enzymatické reakce ve cvičení z biochemie (Výběr a ověření prací pro laboratorní cvičení na PF ZČU)*. Plzeň, 1992. Diplomová práce. Západočeská univerzita v Plzni.
8. Modeling: Enzyme Kinetics. *IGEM* [online]. [cit. 2014-06-24]. Dostupné z: <http://2012.igem.org/Team:Leicester/Modeling>
9. Káš, J., Kodíček, M., Valentová, O.: *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2005. ISBN 80-7080-586-2.
10. Šedivec, V., Richtr, V.: Využití regionálních příležitostí ve výuce chemie. *Biologie-Chemie-Zeměpis*. 2014.
11. Spekol - popis a návod. *Katedra fyziky PŘF UJEP v Ústí nad Labem* [online]. [cit. 2014-06-24]. Dostupné z: 6.
http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=7&cad=rja&uact=8&ved=0CFUQFjAG&url=http%3A%2F%2Ffiles.katfyziky.webnode.cz%2F200000070-1a43e1e11a%2FSpekol-popis_a_navod.pdf&ei=xdCiU775EuSg7Aa7yoDQDA&usg=AFQjCNE02SEuNG_ss0oXVjUtvUTp3A5Jcw&sig2=SePptKgKHxzKnplETeVD5Q&bvm=bv.69411363,d.ZGU