

Enzymy

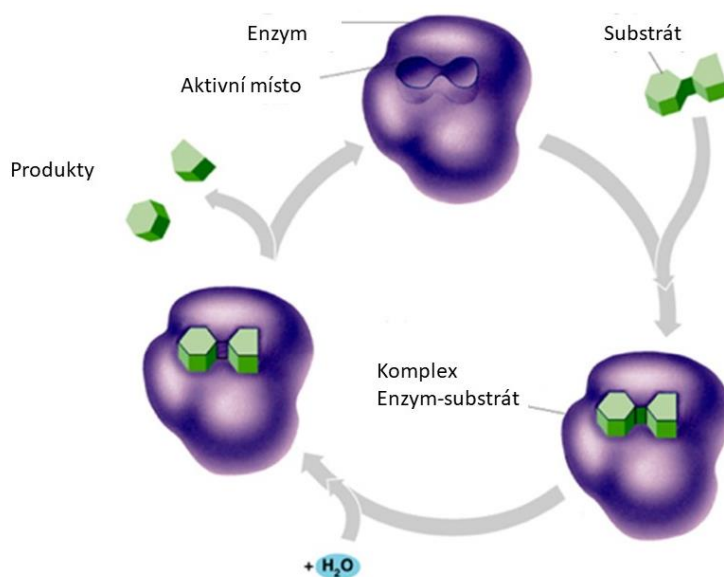
1 Teoretická část

1.1 Enzymy

1.1.1 Základní charakterizace

Většina reakcí metabolismu by v podmínkách organismu (vodné prostředí, teplota, tlak) neprobíhala, nanejvýš velmi pomalu, kdyby nebyly přítomny látky umožňující (urychlující) průběh těchto reakcí. Těmito látkami jsou enzymy, které mají funkci biokatalyzátoru.

Enzymy jsou bílkoviny, mají tedy specifickou strukturu. Chemicky se vážou se sloučeninami (substráty) vstupujícími do reakce za vzniku přechodné, nestálé sloučeniny – komplexu katalyzátor-substrát. Tento komplex se velmi rychle rozpadá a uvolňuje produkty reakce (Obr. 1). Podstatou účinku katalyzátoru je snížení aktivační energie (E_A), kterou molekuly reagujících látek potřebují k uskutečnění reakce. Katalytické účinky si enzymy zachovávají i po uvolnění z buněk. V určitém prostředí a při určitých podmínkách (*in vitro*) mohou enzymy katalyzovat tytéž chemické reakce jako v živých organismech. Základní rozdíl mezi enzymy a ostatními katalyzátory je v tom, že svou specifickou strukturou chemické reakce nejen urychlují, ale i regulují a chemické reakce se přímo účastní.



Obr. 1: Katalytické působení enzymu.

1.1.2 Mechanismus katalytického působení enzymu

Molekuly enzymu při katalytickém působení vážou substráty na svém povrchu, kde probíhá chemická reakce. Místo v molekule enzymu, na které se vážou substráty, nazýváme aktivní místo. Aktivní místo tvoří charakteristické skupiny aminokyselinových zbytků, které mohou specificky vázat reaktivní část molekul určitého substrátu a aktivně se podílet na jeho chemické

přeměně. Na aktivní místo se váže substrát a vytváří enzym-substrátový komplex. Po proběhnutí vlastní chemické reakce se komplex rozpadne a z aktivního centra se uvolní produkty reakce.

1.1.3 Koenzymy a jejich funkce

Enzymy jsou obvykle jednoduché bílkovinné molekuly. Některé enzymy se však skládají z několika bílkovinných podjednotek. Mnohé enzymy potřebují pro svou katalytickou funkci ještě další nebílkovinnou složku – kofaktor. Typickými kofaktory enzymů jsou kovové ionty nebo organické molekuly. Kofaktory můžeme dělit na slabě vázané koenzymy nebo pevně kovalentně vázané prosthetické skupiny. Holoenzymem pak nazýváme enzym, který obsahuje apoenzym (bílkovinná část enzymu) i kofaktor (neproteinová část enzymu).

1.1.4 Rychlost enzymových reakcí

Rychlost chemických reakcí katalyzovaných enzymy závisí na podmínkách, ve kterých probíhají. Největší vliv má množství substrátu (rychlost chemických reakcí vzrůstá s koncentrací substrátu tak dlouho, dokud neobsadí všechna aktivní místa enzymu), množství enzymu (rychlost reakce se zvyšuje přímo úměrně množství enzymu za předpokladu dostatečného množství substrátu), pH prostředí (enzymy mají zpravidla úzkou oblast pH, v níž je účinnost nejvyšší) a teplota prostředí (narůstání rychlosti reakce se při určité teplotě zastaví a při dalším zvyšování začne klesat, příčinou je denaturace apoenzymu).

1.1.5 Inhibice a aktivace enzymu

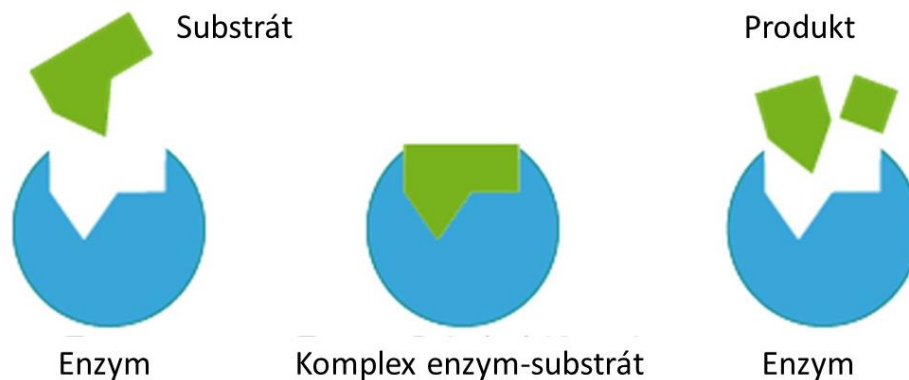
Aktivitu enzymu může ovlivňovat i přítomnost některých nízkomolekulárních sloučenin nebo iontu v reakčním prostředí. Může docházet ke snižování katalytického účinku (inhibici enzymu) nebo ke zvyšování katalytického účinku (aktivace enzymu).

1.1.6 Substrátová specifita

Typickou vlastností enzymů je jejich specifita, tedy schopnost katalyzovat pouze určitou reakci daného substrátu (reagující látky). Tato specifita bývá velmi vyhraněná, což dovoluje buňce přesně rozhodovat o tom, které reakce daného substrátu budou v určitou chvíli preferovány. Na druhou stranu to znamená, že pro každou reakci daného substrátu musí buňka syntetizovat jiný enzym. Specifita je v podstatě dvojí – substrátová a funkční.

Substrátová specifita spočívá v tom, že enzym působí pouze na jeden substrát nebo skupinu substrátů. Enzymy s maximální substrátovou specifitou působí na jedinou sloučeninu nebo dokonce na jediný z jejích izomerů. Většina enzymů však působí na několik blízkce příbuzných látek a některé i na velkou skupinu sloučenin téhož typu (alkoholy, estery,...). Za substrátovou specifitu odpovídá apoenzym. Část apoenzymu, která tyto vlastnosti ovlivňuje, se označuje jako aktivní vazebné místo. Vazebné místo je vlastně otisk substrátu na povrch molekuly (Obr. 2). Tím lze vysvětlit specifitu některých enzymů. Substrát se na enzym váže pomocí slabých molekulových sil.

Funkční specifita znamená, že enzym z několika přeměn substrátu katalyzuje pouze jedinou. Funkční specifita je určována především koenzymem (je-li přítomen), podílí se na ní však i složka bílkovinná.



Obr. 2: Aktivní místo enzymu.

1.1.7 Klasifikace enzymů

Základem klasifikace (rozdělení) enzymů je typ chemické reakce, kterou katalyzují.

Mezinárodní biochemická a molekulárně biologická unie (IUBMB) zavedla nomenklaturické rozdělení enzymů pomocí tzv. EC čísel do 7 hlavních kategorií, které se dále dělí na podkategorie:

- EC 1 – oxidoreduktasy: oxidačně/redukční reakce
- EC 2 – transferasy: přenos funkčních skupin
- EC 3 – hydrolasy: hydrolýza chemických vazeb
- EC 4 – lyasy: štěpení chemické vazby jiným způsobem než hydrolýzou či redoxní reakcí
- EC 5 – izomerasy: isomerizační reakce
- EC 6 – ligasy: kovalentní vazba molekul
- EC 7 – translokasy: transport částic přes membránu

1.2 Amylasy

1.2.1 Živočišná amylasa

α -amylasa, obsažená ve slinách, odbourává škrob za vzniku dextrinů. α -Amylasy patří mezi hydrolasy, konkrétně glykosidasy. Katalyzuje štěpení α -1,4-glykosidické vazby uvnitř sacharidů, které obsahují 3 a více D-glukosových jednotek (oligosacharidy). Toto štěpení probíhá náhodně uvnitř polysacharidového řetězce. Produktem štěpení jsou redukující sacharidy maltosa, maltotriosa a α -limitní dextriny (obsahují průměrně 8 glukosových jednotek s jednou nebo více 1,6-glykosidickými vazbami). α -amylasa nekatalyzuje štěpení 1,6-glykosidické vazby mezi sacharidy a nekatalyzuje štěpení škrobu až na glukosové jednotky. Přítomnost redukujících cukrů je možné dokázat Fehlingovou reakcí (teorie viz úloha Sacharidy).

α -Amylasy ve své molekule obsahuje vázaný iont vápníku, jako kofaktor. Přestože je vápník nutný pro enzymatickou aktivitu α -amylasy jeho příliš vysoká koncentrace může enzym inhibovat. Aktivaci enzymu způsobuje také chloridový aniont. pH optimum α -amylasy je v rozmezí pH 7,0-7,2.

1.2.2 Rostlinné amylasy

Jedná se o enzymy štěpící škrob (lat. amyllum = škrob) a další polysacharidy, ve kterých se vyskytují O-glykosidové vazby α -1,4. Nejdůležitější jsou α -amylasy, která se vytváří až při klíčení sladu a β -amylasy, která je přítomná už v rostlině obilniny.

α -amylasy patří mezi endoenzymy, protože katalyzuje štěpení α -1,4-glykosidické vazby uvnitř řetězců polysacharidů, včetně amylosy i amylopektinu, kromě vnějších vazeb a vazeb následujících po větvení v amylopektinu. Její aktivace se děje v přítomnosti vápenatých, zinečnatých nebo chloridových iontech. Optimální pH α -amylasy je v rozmezí 5–7,2.

β -amylasy je exoenzym, hydrolyzuje tedy α -1,4-glykosidické vazby polysacharidů odštěpením maltosové jednotky od neredukujícího konce řetězce polysacharidu za vzniku β -maltosy. Její optimální pH se pohybuje v rozmezí 5,0–5,6 a aktivita tohoto enzymu závisí mimo jiné i na obsahu dusíku v obilce.

1.3 Sacharasa

Enzym sacharasa se stejně jako amylasy řadí mezi hydrolasy. Sacharasa katalyzuje hydrolýzu sacharosy na monosacharidy glukosu a fruktosu. Směs těchto dvou monosacharidů je sladší než sacharosa samotná a proto se využívá pro výrobu slazených potravin. Z toho důvodu je enzym sacharasa využíván v potravinářském průmyslu. Hlavní zdrojem sacharasy pro průmyslové využití jsou kvasinky. Teplotní optimum enzymu je 60 °C a pH optimum 4,5. Aktivitu enzymu lze stanovit z přírůstkem produktů, tedy redukujících monosacharidů, Fehlingovou reakcí.

1.4 Stanovení škrobu pomocí Lugolova roztoku

Roztok jodu (Lugolovo činidlo) je možné využít k detekci přítomnosti škrobu. Při reakci škrobu s Lugolovým činidlem dochází ke vzniku modrého zbarvení. Při štěpení škrobu na kratší řetězce přechází modré zbarvení nejprve do červené barvy, následně po úplném rozštěpení škrobu přechází roztok až do žlutého zbarvení. Této skutečnosti je možné využít pro stanovení účinku škrob štěpících enzymů, a to jak v průmyslu, tak v laboratoři.

2 Praktická část

2.1 Cíle úlohy

- Porozumět za pomoci tematicky zaměřených úloh základním vlastnostem enzymů.
- Procvičit základní laboratorní dovednosti používané při práci s enzymy.
- Vyzkoušet jednoduché metody detekce enzymových aktivit.

2.2 Materiál

Škrob, sacharosa, pekařské kvasnice.

2.3 Přístroje

Vodní lázně, vařič, digitální předvážky, elektromagnetická míchačka, vortex.

2.4 Chemikálie

Jodid draselný, jód, chlorid sodný, dihydrogenfosforečnan draselný, hydrogenfosforečnan draselný, síran měďnatý pentahydrát, vinan draselnosodný, hydroxid sodný, kyselina citronová.

2.5 Roztoky

- **Lugolův roztok**
10 g jodidu draselného a 5 g jódu se rozpustí ve vodě a doplní na objem 100 ml.
- **0,9% chlorid sodný (fyziologický roztok)**
9 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na objem 1 l.
- **0,5 M fosfátový pufr pH 7,2**
27 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 52,5 g hydrogenfosforečnanu draselného se rozpustí v 850 ml vody, upraví se pH a doplní vodou do 1 l.
- **Fehlingovo činidlo roztok I**
40 g síranu měďnatého pentahydrátu se rozpustí v 500 ml vody a doplní vodou do 1 l.
- **Fehlingovo činidlo roztok II**
229,24 g vinanu draselnosodného a 150 g hydroxidu sodného se rozpustí v 750 ml vody a poté se doplní vodou do 1 l.
- **0,2 M hydrogenfosforečnan sodný**
72 g hydrogenfosforečnanu sodného doplnit vodou do 1 l.
- **0,1 M kyselina citronová**
21 g kyseliny citronové doplnit vodou do 1 l.

2.6 Úkoly

2.6.1 Příprava enzymů (nutno připravit na začátku cvičení)

- **Sacharasa z kvasnic:** 0,1 g pekařských kvasnic rozsuspendujte ve 20 ml destilované vody.
- **Rostlinná amylasa:** Navažte 1 g sladu, ten rozemelte nejemno a extrahujte v 50 ml 0,9% roztoku NaCl po dobu 30 min na vodní lázni nastavené na 45 °C, extrakt přefiltrujte (tak aby byl filtrát čirý).

2.6.2 Příprava substrátů (nutno připravit na začátku cvičení)

- Nařeďte potřebné množství 0,5 M fosfátového pufru na koncentraci 0,1M.
- **Roztok škrobu A:** ve fosfátovém pufru: 0,5 g škrobu rozsuspendujte v 50 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,2 a 5 minut povařte.
- **Roztok škrobu B:** ve fosfátovém pufru: 10x zředěný roztok škrobu A (celkem 50 ml)
- **Roztok škrobu C:** v destilované vodě: 0,5 g škrobu rozsuspendujte v 50 ml destilované vody a 5 minut povařte.
- **Roztok sacharosy:** 1 g sacharosy rozpustěte v 50 ml destilované vody.

2.6.3 Substrátová specifita rostlinné amylasy a sacharosy

Substráty

- Škrob A
- Sacharosa

Enzymy

- Amylasy ze sladu
- Sacharasa z kvasnic

Vlastní pokus

- Podle tabulky (Tab. 1) napipetujte do šesti označených zkumavek 0,5 ml enzymových preparátů (rostlinné amylasy (filtrát extraktu sladu) a sacharosy).
- Zkumavky 2 a 5 povařte 5 minut.
- Do všech zkumavek přidejte 2 ml substrátu, tedy škrobu A nebo sacharosy (Tab. 1).
- Všechny zkumavky inkubujte 30 minut ve vodní lázni nastavené na 38 °C.
- Po ukončení inkubace použijte 1 ml vzorku pro stanovení přítomnosti redukujících látek Fehlingovou reakcí.
- Ve zkumavce smíchejte 1 ml Fehlingova činidla I a 1 ml Fehlingova činidla II s 1 ml vzorku.
- Opatrným povařením vzniká v případě pozitivního výsledku oranžově červená sraženina Cu₂O. Výsledek zapište do tabulky (vyfoťte).
- Zkumavky se zbytkem vzorku doplňte 1 cm pod okraj destilovanou vodou a přidejte kapku Lugolova roztoku (roztok jódu).
- Zkumavky promíchejte pomocí vortexu a výsledek zapište (vyfoťte) do tabulky.

Tabulka 1: Schéma experimentu.

	Zkumavka č.					
	1	2	3	4	5	6
Amylasa (ml)	0,5	0,5	-	-	-	0,5
Sacharasa (ml)	-	-	0,5	0,5	0,5	-
Povařit	-	+	-	-	+	-
Škrob A (ml)	2	2	2	-	-	-
Sacharosa (ml)	-	-	-	2	2	2
Inkubovat 30 min na 38°C						
Výsledek Fehlingovy reakce						
Výsledek Lugolovy reakce						

2.6.4 Optimální pH enzymové reakce α -amylasy

Substrát

- Škrob C

Enzym

- Rostlinná amylasa (filtrát extraktu sladu)

Příprava enzymu a pufrů (pH 3,0 - 8,3)

- Do sady označených čistých zkumavek napipetujte roztok hydrogenfosforečnanu sodného a kyseliny citronové podle tabulky (Tab. 2). Získáte tak sadu pufrů v rozmezí pH 3 - 8,3.
- Do všech zkumavek přidejte 1 ml škrobu C a 1 ml filtrátu extraktu sladu (amylasa), promíchejte a dejte inkubovat do termostatu při 30 °C. Jako slepý vzorek připravte 4 ml kyseliny citronové, do které přidáte 1 ml škrobu C a 1 ml filtrátu sladu (roztok amylasy).

Tabulka 2

Zkumavka č.	Kyselina citronová (ml)	Na ₂ HPO ₄ (ml)	pH	Reakce s Lugolovým činidlem
0	4	0	blank	
1	3,2	0,8	3	
2	2,6	1,4	4	
3	2	2	4,8	
4	1,75	2,25	5,4	
5	1,6	2,4	5,8	
6	1,1	2,9	6,6	
7	0,7	3,3	7	
8	0,25	3,75	7,6	
9	0,1	3,9	8	
10	0	4	8,3	

Určení stupně rozštěpení substrátu

- Po 15 minutách inkubace odpipetujte 0,5 ml obsahu zkumavky č. 7 do čisté zkumavky, zředte vodou 1 cm pod okraj zkumavky a pomocí Lugolova roztoku vyzkoušejte, zda došlo k úplnému rozštěpení škrobu amylasou (modré zbarvení škrobu se musí změnit na žluté). Pokud je roztok stále modrý, pokračujte dále v inkubaci a zkoušku proveďte za dalších 5 minut.
- Reakční směsi inkubujte při 30 °C dalších 15 min (celkem tedy 30 min).
- Roztoky ve zkumavkách doplňte odhadem asi na 10 ml destilovanou vodou, poté přidejte kapku Lugolova roztoku. Vizuálně odhadněte intenzitu zbarvení v závislosti na pH prostředí enzymové reakce a запиšte do tabulky.

2.6.5 Aktivita rostlinné amylasy

Substrát

- Škrob B

Enzymy

- Rostlinná amylasa ze sladu

Příprava reakcí

- Nachystejte sadu 8 zkumavek a očísľujte je.
- Připravte 8 roztoků se snižující se koncentrací amylasy (extraktu sladu) dle následujícího ředění.
- Do první zkumavky napipetujte 2 ml extraktu a 2 ml vody.

- Z této zkumavky po promíchání roztoků odpipetujte 2 ml do zkumavky následující (č. 2) a přidejte 2 ml vody.
- Obsah zkumavky promíchejte a pokračujte stejným způsobem v dalších zkumavkách v přípravě zředěných roztoků amylasy.
- Z poslední zkumavky (č. 8) odpipetujte 2 ml roztoku do odpadu.
- V každé zkumavce máte 2 ml roztoku vždy 2x koncentrovanějšího, než ve zkumavce následující.

Stanovení aktivity rostlinné amylasy

- Do každé zkumavky rychle napipetujte 4 ml roztoku škrobu B.
- Zkumavky vložte do termostatu nastaveného na teplotu 38 °C.
- Po 30 minutách zkumavky ochlaďte na ledové lázni a doplňte vodou 2 cm pod okraj zkumavky.
- Do každé zkumavky přidejte 1 kapku Lugolova roztoku, který obsahuje jód.
- Za základ výpočtu berte množství extraktu v té zkumavce, ve které je roztok zbarven červeně.

2.7 Vyhodnocení

2.7.1 Substrátová specifita rostlinné amylasy a sacharasy

- Výsledky Fehlingovy reakce a zbarvení jódem zapište do tabulky.
- Vyhodnoťte z hlediska substrátové specifity enzym obsažený v extraktu sladu a v pekařských kvasnicích.

2.7.2 Optimální pH enzymové reakce α -amylasy

- Do tabulky uveďte stupeň rozštěpení škrobu enzymem v závislosti na pH.

2.7.3 Aktivita rostlinné amylasy

- Konvenční jednotka aktivity rostlinné amylasy (označuje se D 38°. 30 min, D odvozeno od diastasa – obecný název pro enzymy štěpící polysacharidy) je definovaná jako množství roztoku enzymu v mililitrech, jež stačí k rozštěpení 1 ml 0,1% roztoku škrobu do stupně erythrodextrinu. Amylasy má ve zkumavce, ve které je roztok zbarven červeně, aktivitu 4 jednotky.
- Vypočítejte aktivitu amylasy v připraveném extraktu sladu.