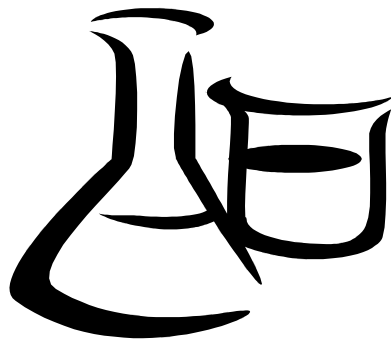


# Enzymy

---

Praktické cvičení z lékařské biochemie  
*Všeobecné lékařství*

Jiří Kraml, Jiřina Crkovská  
a Martin Vejražka



2018/2019

# Obsah

## **DŮKAZ SPECIFIČNOSTI ENZYMŮ 3**

PRINCIP 3

REAGENCIE 4

PRACOVNÍ POSTUP 4

HODNOCENÍ REAKCE 5

## **VLIV PH NA AKTIVITU ENZYMU 5**

PRINCIP 5

REAGENCIE 5

PRACOVNÍ POSTUP 6

VYHODNOCENÍ 6

## **VLIV KONCENTRACE SUBSTRÁTU NA RYCHLOST ENZYMOVÉ REAKCE. MICHAELISOVA KONSTANTA. 6**

PRINCIP 6

REAGENCIE 7

PRACOVNÍ POSTUP 7

VYHODNOCENÍ 8

V tomto praktickém cvičení demonstrováme specifitu enzymů. Porovnáme přitom dva enzymy, které oba katalyzují hydrolýzu glykosidových vazeb – sacharázu a amylázu.

Dále ukážeme vliv fyzikálně-chemických podmínek na aktivitu enzymu, konkrétně vliv pH na aktivitu pepsinu.

Nakonec v pokuse s laktátdehydrogenázou ukážeme závislost rychlosti enzymové reakce na výchozí koncentraci substrátu a práci s Michaelisovou konstantou  $K_m$ .

## Důkaz specifity enzymů

### Princip

Enzymy působí specificky jak vzhledem k **typu** katalyzované reakce, tak i vzhledem k **substrátu**. Pokud jde o **substrát**, mají některé enzymy poměrně širokou **specifitu**, např. některé esterázy štěpí nejrůznější přirozené i umělé estery. Jiné enzymy mají specifitu velice úzkou, jako např. ureáza, která štěpí pouze močovinu.

**Glykosidázy** patří mezi hydrolázy (podpodtřída 3.2.1 mezinárodní nomenklatury enzymů). Jsou specifické vůči **typu glykosidové vazby** ( $\alpha$ -glykosidázy nebo  $\beta$ -glykosidázy).

**Sacharáza z kvasnic** je  **$\beta$ -fruktofuranosidáza**, která štěpí  $\beta$ -glykosidovou vazbu v sacharóze. Na první pohled podobná **sacharáza z kartáčového lemu enterocytů** tenkého střeva savců, sacharosa- $\alpha$ -D-glukohydrolasa (EC 3.2.1.48), má odlišnou specifitu – štěpí  $\alpha$ -glykosidovou vazbu, takže kromě **sacharózy** hydrolyzuje i **maltózu**.

**Amyláza**, ať už rostlinného nebo živočišného původu, štěpí **1,4- $\alpha$ -glykosidové** vazby škrobu, glykogeny a polysacharidů. Vazby  $\beta$ -glykosidové, např. v celulóze, hydrolyzovat nedokáže.

Jako  **$\alpha$ -amyláza** se označuje enzym, který se vyskytuje ve slinách a pankreatické šťávě živočichů. Štěpí **endohydrolýzou 1,4- $\alpha$ -glukosidové vazby** polysacharidů obsahujících 3 a více 1,4- $\alpha$ -glykosidově vázaných glukózových jednotek. Jde tedy o 1,4- $\alpha$ -D-glukan-glukanohydrolasu (EC 3.2.1.1). Výsledkem hydrolytického štěpení amylózy je směs **maltózy** a **glukózy** s hemiacetalovými hydroxyly uvolněnými jako  **$\alpha$ -anomery**. Amylopektin a glykogen štěpí  $\alpha$ -amyláza náhodně na 1,4- $\alpha$ -glykosidových vazbách, přičemž **1,6- $\alpha$ -** vazby zůstávají nedotčeny. Výslednými produkty tak jsou **větvené i nevětvené oligosacharidy**. Enzymová hydrolýza **škrobu**  $\alpha$ -amylázou má několik fází, které se projeví také reakcí s jódem. Škrob se barví jódem temně modře, štěpné polysacharidy – dextriny fialově (amyloextrin), purpurově až červeně (erythroextrin), popř. se nebarví jódem vůbec (achroextrin). Během štěpení škrobu také ve směsi přibývá redukujících cukrů.

Jako  **$\beta$ -amyláza** se označoval enzym **rostlinného původu**, obsažený např. ve **sladu**, který štěpí **1,4- $\alpha$ -glukosidové** vazby od neredukujícího konce polysacharidového řetězce. Z amylózy tak vzniká **maltóza**, která se uvolňuje jako  **$\beta$ -anomer**, dochází tedy k inverzi. Tento enzym, označovaný nyní systematicky jako  $\alpha$ 1,4- $\alpha$ -D-glukan-maltohydrolasa (EC 3.2.1.2), štěpí amylopektin (a glykogen) rovněž z neredukujícího konce až k větvení **1,6- $\alpha$ -**, které už tento enzym rozštěpit nemůže. Konečný produkt tohoto typu hydrolýzy škrobu je tzv. limitní dextrin. Ani živočišná  $\alpha$ -amyláza, ani rostlinná  $\beta$ -amyláza tedy **neštěpí vazby 1,6- $\alpha$ -**, ani **1,4- $\beta$ -glykosidovou vazbu**.

Jako tzv.  **$\gamma$ -amyláza (glukoamyláza)** se označuje enzym obsažený v **membráně enterocytů** tenkého střeva. Je termostabilní (proto též označení *termostabilní maltáza*) a štěpí






**polysacharidy** a ještě lépe **maltózu**. Hydrolýza probíhá od neredukujícího konce, štěpí se při ní vazby **1,4- $\alpha$**  a výsledným produktem je  **$\beta$ -glukóza**. Systematické označení  $\gamma$ -amylázy je 1,4- $\alpha$ -D-glukosid-glukohydrolasa, EC 3.2.1.20.

Vazby **1,6- $\alpha$** , které zůstávají v **izomaltóze**, **amylopektinu**, **glykogenu** a **oligosacharidech**, jež vznikly v tenkém střevě trávením škrobu a glykogenu  **$\alpha$ -amylázou**, se odbourávají převážně **izomaltázovou** podjednotkou **sacharázového-izomaltázového komplexu** kartáčového lemu, oligosacharid- $\alpha$ -glukohydrolázou, EC 3.2.1.10 (oligo-1,6-glukosidasa).

Sacharázový-izomaltázový komplex kartáčového lemu se syntetizuje jako jediný polypeptidový řetězec. Proteolytické enzymy z lumen tenkého střeva pak tento bílkovinný řetězec naštěpí, čímž vzniknou samostatné funkční podjednotky sacharázového-izomaltázového komplexu. Obě podjednotky katalyzují hydrolýzu **maltózy** (reprezentují asi 80 % veškeré maltázové aktivity tenkého střeva). Kromě toho dokáže **sacharázová** podjednotka štěpit i **sacharózu**. **Izomaltázová** podjednotka může také odbourávat vazby **1,6- $\alpha$** - (např. v izomaltóze či v dextrinech).

V této úloze vyzkoušíme, jaká je specifčnost sacharázy z kvasnic a slinné amylázy. Oběma enzymům jako substrát nabídneme sacharózu a škrob.

## Reagencie

- škrobový maz 10 g·l<sup>-1</sup> (1 g škrobu třepat nebo zahřívat s vodou, suspenzi lít pomalu do 100 ml vroucí vody, povařit 2–3 minuty)
- sacharóza 10 g·l<sup>-1</sup> (roztok denně čerstvý)
- sacharáza z kvasnic
- $\alpha$ -amyláza: sliny zředěné v poměru 1:10
- Fehling I: CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O 70 g·l<sup>-1</sup>  
- Fehling II: NaOH 250 g a vinan draselno-sodný 350 g v 1 l čištěné vody 
- Lugolův roztok: jód 20 g v 1 l nasyceného roztoku jodidu draselného  ; pro použití se ředí 5 kapek Lugolova roztoku do 5 ml čištěné vody

## Pracovní postup

- Připravte roztok amylázy: v kádince zřeďte malé množství slin přibližně 10× čištěnou vodou.
- Očíslujte čtyři zkumavky a smíchejte v nich reakční směsi dle tabulky:

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>škrob</b>	5 ml	–	5 ml	–
<b>sacharóza</b>	–	5 ml	–	5 ml
<b>amyláza</b>	1 ml	1 ml	–	–
<b>sacharáza</b>	–	–	1 ml	1 ml

- Všechny zkumavky inkubujte 30 minut v termobloku při 37 °C.

## Hodnocení reakce

Určete, ve kterých zkumavkách se účinkem enzymů substrát rozštěpil na redukující sacharidy, pomocí Fehlingovy zkoušky:

4. Připravte asi 10 ml Fehlingova činidla smísením přibližně stejných dílů roztoku síranu měďnatého  $\text{CuSO}_4$  a činidla Fehling II  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ .
5. Přibližně 0,5 ml každého testovaného roztoku (tj. každé ze směsí ve zkumavkách 1–4) přeneste do nové zkumavky, přidejte přibližně stejné množství Fehlingova roztoku a zahřejte ve vroucí vodní lázni. Sledujte barevné změny.

Zjistěte, ve kterých zkumavkách zůstal nerozštěpený škrob:

6. Přibližně 0,5 ml každého testovaného roztoku přeneste do nové zkumavky a přidejte několik kapek zředěného Lugolova roztoku. Sledujte barevné změny.

## Vliv pH na aktivitu enzymu

### Princip

Vliv pH na aktivitu enzymu ukážeme na příkladu pepsinu. Pepsin je trávicí enzym, který štěpí bílkoviny. Různé živočišné druhy tvoří různé, mírně odlišné formy pepsinu s různým označením. Všechny patří do podpodtřídy **aspartátových endopeptidáz** (EC 3.4.23), tj. v aktivním centru obsahují dva proti sobě orientované zbytky kyseliny asparagové, které se podílejí na kyselé katalýze. Pepsiny nejlépe pracují v kyselém prostředí. U člověka vzniká aktivní pepsin z neaktivního prekurzoru, pepsinogenu, odštěpením části polypeptidového řetězce. K této aktivaci může dojít buď samovolně (**autoaktivací**) při pH nižším než 5, nebo působením již aktivní molekuly pepsinu (**autokatalýzou**). Peptidy, které se během aktivace pepsinogenu odštěpily, zůstávají navázané na pepsin a působí jako **inhibitory** pepsinové aktivity. Posledním krokem aktivace enzymu tak je oddělení těchto inhibičních peptidů, k němuž dojde při poklesu pH prostředí pod 2.

Lidský **pepsin A** má 5 molekulárních forem. Hydrolyzuje peptidové vazby uvnitř polypeptidového řetězce (endohydrolyza), přičemž je specifický k oblastem, které obsahují hydrofobní aminokyselinové zbytky – především aromatické (Phe), ale i alifatické (Leu). V jiných částech žaludku se podobným mechanismem tvoří i **pepsin B**. Další enzym, **pepsin C**, se u člověka označuje také jako **gastriksin**. Štěpí endohydrolyzou přednostně peptidové vazby za zbytkem aminokyseliny Tyr a je méně specifický než pepsin A.

Optimální pH pepsinu poněkud kolísá podle toho, jaký substrát má tento enzym hydrolyzovat. Např. pro vaječný albumin je pH optimum pepsinu A kolem 1,5, pro hemoglobin je vyšší (2,3).


V praktické úloze se pokusíme odhadnout, v jaké oblasti leží pH optimum pepsinu pro bílkoviny vaječného bílku.

### Reagencie

1. roztok pepsinu  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
2.  $\text{HCl } 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{HCl}$
3. suspenze vaječného bílku (vařený vaječný bílek se homogenizuje ve fyziologickém roztoku – konečná koncentrace asi  $300 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ )

## Pracovní postup

1. Do čtyř označených zkumavek napipetujte roztoky podle tohoto tabulky (objemy v ml)

Výsledné pH:	1,2	1,5	2,5	kontrola
roztok pepsinu	2,0	2,0	2,0	0
HCl 0,1 mol·l <sup>-1</sup> 	4,0	2,0	0,2	2,0
Čištěná voda	–	2,0	3,8	4,0
suspenze vaječného bílku	1,0	1,0	1,0	1,0

2. Inkubujte 20 min při 37 °C v termobloku.

## Vyhodnocení

Po skončení inkubace se hodnotí projasnění obsahu zkumavek, ke kterému došlo natrávením bílkovin vaječného bílku. Použijte semikvantitativní stupnici:

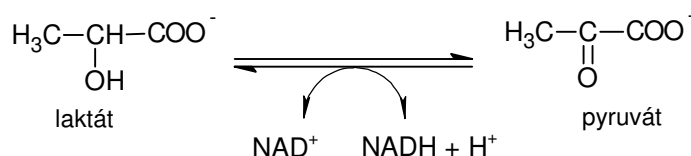
úplné projasnění +  
částečné projasnění ±  
nezměněný zákal – .

Výsledky zapište do tabulky v protokolu. Určete, v jaké oblasti pH leží optimum pro práci enzymu.

## Vliv koncentrace substrátu na rychlost enzymové reakce. Michaelisova konstanta.

### Princip

V této úloze použijeme laktátdehydrogenázu (L-laktát:NAD<sup>+</sup>-oxidoreduktasa, E.C. 1.1.1.27), která katalyzuje oxidaci aniontu kyseliny mléčné na aniont kyseliny pyrohroznové. Koenzymem reakce je NAD.

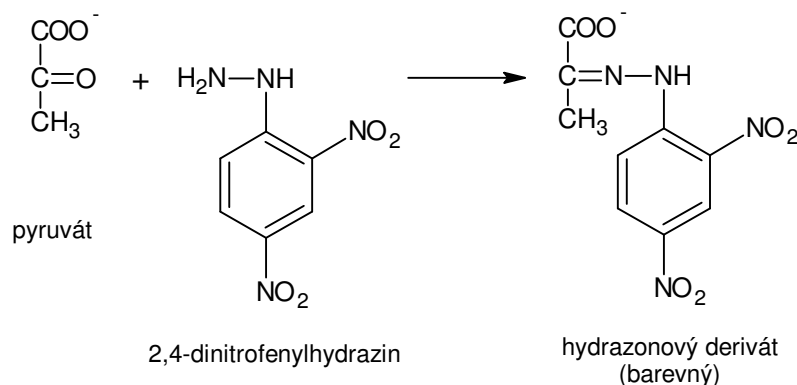


Budeme sledovat závislost rychlosti enzymové reakce  $v$  na koncentraci substrátu  $[S]$ . Jelikož po namíchání reakční směsi koncentrace substrátu postupně klesá, jak je v reakci spotřebováván, a odpovídajícím způsobem se postupně mění i reakční rychlost, měli bychom přesněji mluvit o počáteční koncentraci substrátu  $[S]_0$ , pro niž se budeme snažit odhadnout počáteční rychlost  $v_0$ .

Uspořádání pokusu bude takové, že připravíme několik reakčních směsí, které se budou lišit počáteční koncentrací substrátu – laktátu (tj.  $[S]_0$  bude pokaždé jiné). Množství

enzymu, laktát dehydrogenázy (LD), bude ve všech případech stejné. Změříme, jakou rychlostí vzniká produkt reakce, pyruvát.

Protože pyruvát je bezbarvá látka, která se nehodí pro přímé fotometrické stanovení, změříme jeho koncentraci pomocí reakce s 2,4-dinitrofenylhydrazinem. Tato látka reaguje v kyselém prostředí s oxosloučeninami za vzniku hydrazonových derivátů. Ty jsou po alkalizaci barevné.



Reakce se všemi koncentracemi substrátu  $[S]_0$  necháme probíhat přesně stejně dlouhou dobu a pak je ukončíme prudkým okyselením. Množství vytvořeného pyruvátu bude (přibližně) přímo úměrné reakční rychlosti  $v_0$ , takže i naměřená absorbance barevného hydrazonového produktu bude této rychlosti přímo úměrná. Díky tomu můžeme absorbanci použít jako měřítko reakční rychlosti.

Získané dvojice  $[S]_0$  a  $v_0$  vyneseme do grafu a pokusíme se znázornit vzájemnou závislost obou veličin. Pokusíme se také odhadnout Michaelisovu konstantu laktátdehydrogenázy pro laktát.

## Reagencie

1. Enzym (preparát laktátdehydrogenázy) – homogenát krysích jater
2. Laktát sodný  $0,6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
3. Reakční pufr TRIS-HCl  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , pH 8,5 s přidavkem hovězího albuminu  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
4.  $\text{NAD}^+$   $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  v reakčním pufru
5. 2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH) v HCl  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$
6. NaOH  $0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

## Pracovní postup

1. Pět zkumavek označíme S1 až S5 a připravíme do nich roztoky substrátu (laktátu) o různých koncentracích. Zásobní roztok ( $600 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) se sériově ředí podle tabulky:

Zkumavka	Laktát		Pufr	Koncentrace
S1	Zásobní roztok	1 ml	–	$600 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
S2	Zásobní roztok	1 ml	1 ml	$300 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
S3	Ze zkumavky S2	1 ml	1 ml	$150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
S4	Ze zkumavky S3	1 ml	1 ml	$75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
S5	Ze zkumavky S4	1 ml	1 ml	$37,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

2. Označíme šest zkumavek a zpracujeme je podle tabulky (objemy v mililitrech):

Zkumavka	1	2	3	4	5	kontrola
Substrát						
S1	0,2	–	–	–	–	–
S2	–	0,2	–	–	–	–
S3	–	–	0,2	–	–	–
S4	–	–	–	0,2	–	–
S6	–	–	–	–	0,2	0,2
NAD <sup>+</sup>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Preinkubovat přibližně 5 minut při 37 °C. Pak přidávat v přesně 30sekundových intervalech:						
Enzym	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	–
Promíchat a inkubovat 15 minut při 37 °C. Pak přidávat v přesně 30sekundových intervalech:						
DNPH	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Enzym	–	–	–	–	–	0,1
Promíchat a nechat stát přibližně 15 minut při laboratorní teplotě.						
Hydroxid sodný	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Promíchat a měřit absorbanci při 505 nm proti kontrole.						

## Vyhodnocení

### Počáteční koncentrace $[S]_0$ :

Enzymová reakce probíhala v každé zkumavce v 0,6 ml reakční směsi sestavené z 0,2 ml roztoku substrátu, 0,3 ml NAD<sup>+</sup> a 0,1 ml enzymu. Roztok substrátu tedy tvořil třetinu reakční směsi, takže počáteční koncentrace substrátu byly:

Zkumavka	$[S]_0$
1	200 mmol·l <sup>-1</sup>
2	100 mmol·l <sup>-1</sup>
3	50 mmol·l <sup>-1</sup>
4	25 mmol·l <sup>-1</sup>
5	12,5 mmol·l <sup>-1</sup>



### **Závislost reakční rychlosti na počáteční koncentraci substrátu**

Vyneste do grafu  $A_{505}$  proti  $[S]_0$  a proložte vhodnou regresní křivku. Rozhodněte, jaký kinetický model za daných podmínek nejlépe tuto závislost popisuje.

### **Stanovení Michaelisovy konstanty**

Sestrojte dvojitě reciproký graf podle Lineweavera a Burka, tj. vyneste hodnoty  $1/A_{505}$  proti  $1/[S]_0$ . Najděte regresní přímku, která naměřené body nejlépe prokládá.

Takto sestavená regresní přímka protíná vodorovnou osu v bodě  $-1/K_m$ .