

Blok metabolismy

Sacharidy



Praktické cvičení z lékařské biochemie

Lenka Fialová, Jan Pláteník

2025/2026

Obsah

ÚVOD	3
TEORIE K ÚLOHÁM.....	4
Sacharidy v potravě.....	4
Úloha 1 Enzymová hydrolýza škrobu α -amylázou	6
Úloha 2 Stanovení aktivity α -amylázy v séru (S-AMS).....	8
Úloha 3 Enzymové štěpení disacharidů	9
Úloha 4 TLC chromatografie sacharidů.....	11
NÁVODY K ÚLOHÁM	13
Úloha 1 Enzymová hydrolýza škrobu α -amylázou	13
Úloha 2 Stanovení aktivity amylázy v séru (S-AMS)	16
Úloha 3 Enzymové štěpení disacharidů	17
Úloha 4 TLC chromatografie sacharidů.....	18
ZÁVĚR	20
POUŽITÁ A DOPORUČENÁ LITERATURA	21



Úvod

Vstupní kazuistika

Studentka Jana si stěžuje na neurčité gastrointestinální obtíže. Často pocituje nadýmání, plynatost, bolesti břicha a někdy má i průjem. Obtíže se dostavují zejména po jídlech jako jsou těstoviny, pečivo a také po mléčných výrobcích.

Její kamarád Jakub, student lékařské fakulty, se domnívá, že jednou z příčin jejích obtíží by mohlo být narušené trávení sacharidů.

Klinické projevy poruch trávení sacharidů **nadýmání, bolesti břicha a průjem** jsou způsobené přítomností nestrávených oligosacharidů v tlustém střevě, kde jsou metabolizovány enzymy střevní mikroflóry. Působením bakteriálních enzymů vznikají plynné látky jako je vodík, oxid uhličitý a metan, které způsobují zmíněné nadýmání, plynatost a bolesti břicha. Příčinou průjmů jsou nestrávené oligosacharidy a produkty jejich bakteriálního metabolismu, které jako osmoticky aktivní látky na sebe vážou vodu.



Náplň a cíle praktického cvičení Aminokyseliny a bílkoviny

Praktické úlohy v tomto cvičení pomohou porozumět chemické podstatě trávení sacharidů v lidském těle. Poskytnou východisko pro pochopení pochodů, ke kterým dochází u základních poruch trávení sacharidů, jako je např. laktózová intolerance či pankreatická insuficience. Současně při ověření funkce enzymů se student prakticky seznámí s vybranými reakcemi sacharidů a s jednou z chromatografických metod.

Shrnutí cílů praktického cvičení Sacharidy:

- Pochopení chemické podstaty trávení sacharidů.
- Ověření funkce trávicích enzymů.
- Praktické seznámení se s vybranými reakcemi sacharidů a chromatografickými metodami.



Sacharidy v potravě

Sacharidy jako snadno dostupný zdroj energie představují důležitou součást potravy. Pokrývají 50 – 55 % energetické potřeby. V potravě jsou obsaženy monosacharidy, disacharidy a polysacharidy.

K častěji zastoupeným **monosacharidům** patří glukóza a fruktóza, z **disacharidů** především sacharóza, popř. laktóza a maltóza a z **polysacharidů** je obvyklou součástí potravy v rostlinných produktech škrob a v potravě živočišného původu může být malé množství glykogenu.

Hlavní zástupci sacharidů

- **Glukóza**

Glukóza (hroznový cukr, dextróza) je obsažena ve zralém ovoci a v dalších potravinách. Dále je stavební součástí disacharidů maltózy, laktózy a sacharózy a polysacharidů škrobu a glykogenu, z nichž se glukóza uvolňuje při jejich štěpení.

- **Fruktóza**

Fruktóza (ovocný cukr, levulóza) je nejsladší ze všech cukrů. Ve volné formě je obsažena zejména v ovoci a medu a je součástí disacharidu sacharózy.

- **Sacharóza**

Sacharóza (řepný, třtinový cukr) je využívána v potravě pro svoji sladkou chuť jako nejobvyklejší sladidlo. Spotřeba sacharózy je významně vyšší ve srovnání s ostatními monosacharidy a disacharidy. Naše země patří k oblastem s vysokou spotřebou sacharózy.

- **Maltóza**

Maltóza (sladový cukr) je disacharid, tvořený dvěma molekulami glukózy spojenými α -(1,4)-glykosidovou vazbou. V různém množství se vyskytuje ve většině potravin. Důležitým zdrojem maltózy je škrob, z něhož vzniká enzymovým štěpením. Hydrolýzou škrobu vzniká v klíčících semenech (např. ječmene).

- **Laktóza**

Laktóza (mléčný cukr) je disacharidem typickým pro mléko. Je tvořena z molekul galaktózy a glukózy, které jsou spojené β -1,4-glykosidovou vazbou.

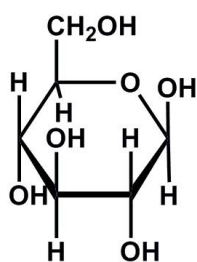
- **Škrob**

Škrob, který je syntetizovaný v rostlinách, představuje běžnou součást naší potravy obsaženou hlavně v bramborách, obilovinách a luštěninách.

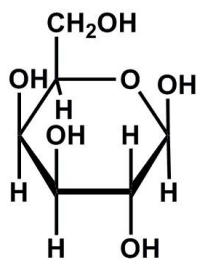
Škrob je homopolysacharid tvořený glukózovými monosacharidovými jednotkami. Podle charakteru glykosidových vazeb, kterými jsou molekuly glukózy spojeny, rozlišujeme dvě složky škrobu – amyulózu a amylopektin.

- ✓ **Amylóza** je tvořena nerozvětveným řetězcem s *α -1,4-glykosidovými vazbami*, který je svinut do šroubovice.
- ✓ Polysacharidový řetězec **amylopektinu** je větvený. Ze základního řetězce, v němž jsou glukózové jednotky vázány *α -1,4-glykosidovými vazbami*, odstupují postranní řetězce napojené *α -(1,6)-glykosidovými vazbami*

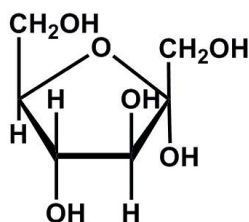
MONOSACHARIDY



D-Glukosa

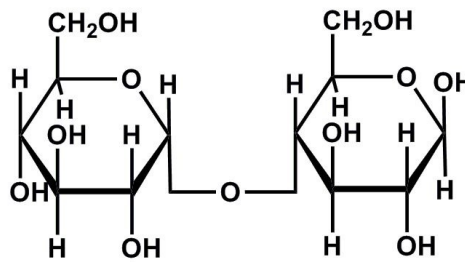


D-Galaktosa

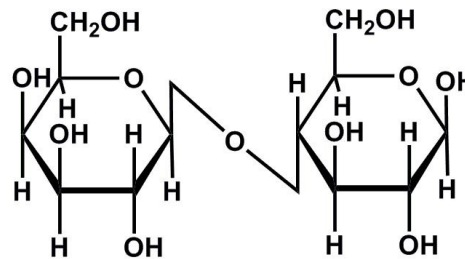


D-Fruktosa

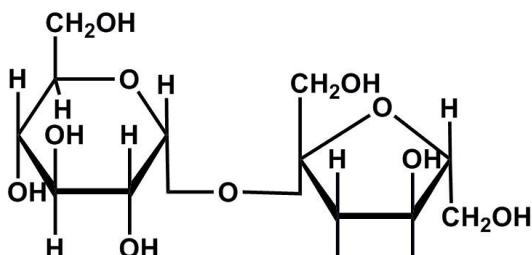
DISACHARIDY



Maltosa



Laktosa



Sacharosa

Úloha 1 Enzymová hydrolýza škrobu α -amylázou

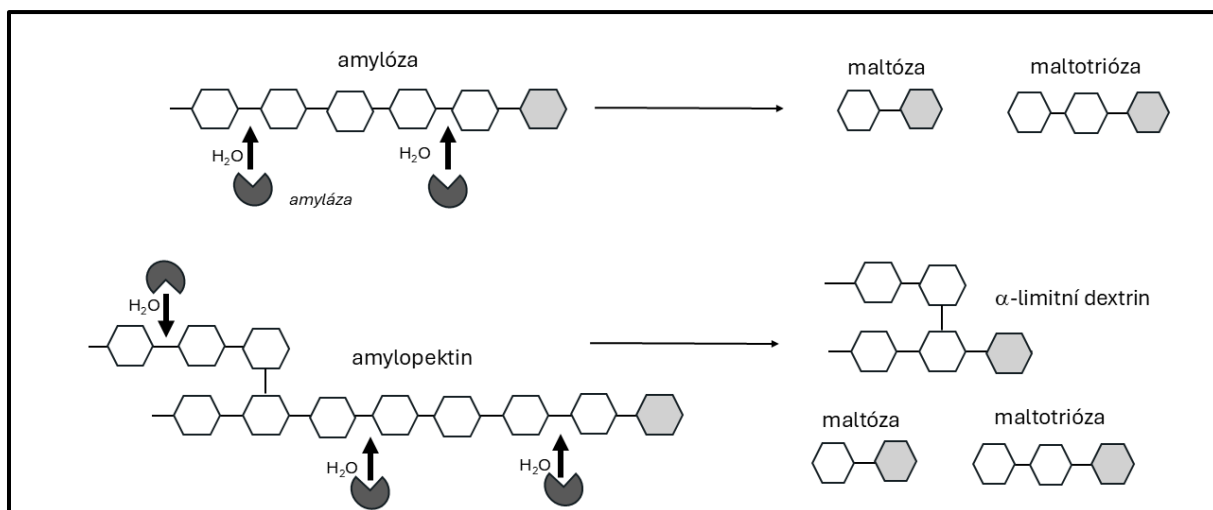
Charakteristika a funkce α -amylázy

α -amyláza (EC 3.2.1.1) je enzym ze skupiny **hydroláz**. Specificky katalyzuje hydrolýzu **α -1,4-glykosidových vazeb** v polysacharidech obsahujících tři nebo více glukózových jednotek spojených tímto typem vazeb. U člověka je **α -amyláza** produkována **serózními buňkami slinných žláz** (slinná α -amyláza), z nichž se uvolňuje do slin, a dále **exokrinní částí pankreatu** (pankreatická α -amyláza), odkud je vylučována do **pankreatické šťávy**.

Hlavním substrátem α -amylázy u člověka je **škrob**.

Působením α -amylázy na škrob dochází k **náhodné endohydrolýze α -1,4-glykosidových vazeb** (uvnitř polysacharidového řetězce), při které vznikají **maltóza**, **maltotrióza**, různé **oligosacharidy (dextriny)** a malé množství glukózy. V případě amylopektinu zůstávají **α -1,6-glykosidové vazby neporušené**, čímž vznikají tzv. **α -limitní dextriny** – oligosacharidy s větvením, které α -amyláza dále neštěpí.

Štěpení škrobu α -amylázou



Slinná amyláza iniciuje **trávení škrobu v ústní dutině**. Její aktivita vyžaduje neutrální pH, proto v kyselém prostředí žaludku již nepůsobí a další trávení škrobu pokračuje působením pankreatické amylázy v **duodenu**.

Sledování hydrolýzy škrobu α -amylázou

Průběh enzymové hydrolýzy škrobu lze sledovat pomocí **reakce s jódem**, za použití **Lugolova roztoku**. Intaktní škrob poskytuje s jódem **intenzivní modré zbarvení**, zatímco částečně hydrolyzované produkty (dextriny) se zbarvují podle stupně štěpení.

Postupující degradaci škrobu lze také kontrolovat pomocí **detekce redukujících oligosacharidů**, které při hydrolýze vznikají. Tyto cukry je možné prokázat klasickými **redukčními testy**, jako je **Benedictova** nebo **Fehlingova reakce**.

Vybrané reakce sacharidů

• Reakce na průkaz škrobu

Pro důkaz škrobu se používá reakce **s Lugolovým roztokem**, což je roztok jódu v jodidu draselném, který zvyšuje rozpustnost jódu ve vodě. Za tmavě modré zbarvení škrobu při reakci

s Lugolovým roztokem je zodpovědná amylóza, do dutiny jejíž šroubovice vstupuje jód ve formě polyjodidových iontů.

Amylopektin vytváří s Lugolovým roztokem červenohnědé až červené zbarvení. Podobně reaguje i glykogen, který je rovněž jako amylopektin větvený.

Produkty štěpení škrobu reagují odlišným zbarvením. Čím je jejich řetězec **kratší**, tím se vyvine **slabší nebo žádná reakce s jódem**:

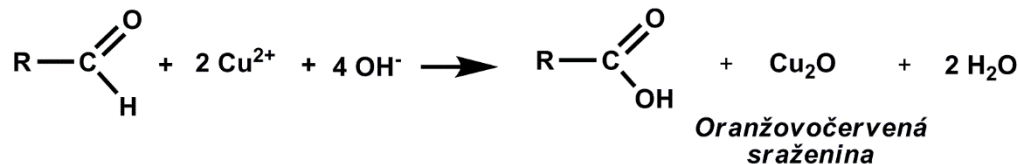


- ✓ fialově (amylodextriny – delší lineární řetězec, vzniklý z amylózy)
- ✓ červenofialově (erytrodextriny – středně dlouhý řetězec, někdy větvený)
- ✓ bez zbarvení (achrodextriny – produkty pokročilé hydrolyzy s krátkými řetězci bez helixové struktury)

• Reakce na průkaz redukčních vlastností sacharidů

Z analytického hlediska je důležité dělení sacharidů na redukující a neredukující. Podmínkou redukčních vlastností sacharidů je přítomnost volné nebo potenciálně volné aldehydové funkční skupiny. Redukující sacharidy jsou schopny za vyšších teplot redukovat ionty těžkých kovů (např. Ag^+ , Cu^{2+} , Bi^{3+}), které jsou vázané v komplexu.

Zmíníme reakce využívající oxidační činidla obsahující Cu^{2+} v alkalickém prostředí, jako je tomu v případě **Fehlingovy a Benedictovy reakce**, nebo ve slabě kyselém prostředí u **Barfoedovy reakce**. Redukce Cu^{2+} na Cu^+ je spojena s oxidací aldehydové skupiny na karboxylovou skupinu a projeví se vznikem oranžovočervené sraženiny Cu_2O , popř. žlutě zbarveného CuOH , který při vyšší teplotě rovněž přechází na Cu_2O .



Benedictovu a Fehlingovu reakci obecně poskytují redukující sacharidy. Alkalické prostředí vytváří podmínky pro izomerizaci sacharidů a tvorbu meziproductů se silnými redukčními účinky. Proto v reakcích, kde je alkalické prostředí, reagují jak monosacharidy, tak i redukující disacharidy rychle a silně, takže není možné odlišení redukujících monosacharidů a disacharidů.

Pomocí **Barfoedovy reakce** lze rozlišit redukující monosacharidy od redukujících disacharidů. Redukce monosacharidů pomocí Cu^{2+} ve slabě kyselém prostředí bude probíhat rychleji ve srovnání s redukujícími disacharidy, jejichž redukční schopnosti jsou za těchto podmínek slabší.

Výše uvedené zkoušky nejsou specifické pouze pro redukující sacharidy – pozitivní výsledek mohou vykazovat i jiné sloučeniny s redukčními účinky, například kyselina askorbová (vitamin C) nebo kyselina homogentisová. V rutinní laboratorní diagnostice se prakticky nepoužívají, ale dobře demonstrují redukční vlastnosti sacharidů.

Význam a hodnocení vybraných reakcí sacharidů

Reakce	Činidlo	Využití	Pozitivní výsledek	
Reakce s Lugolovým roztokem	Roztok jódu a jodidu draselného	Důkaz škrobu	Škrob	Tmavomodré zbarvení
Fehlingova reakce	Cu^{2+} v komplexu s vinanem, alkalické pH	Odlišení redukujících sacharidů od neredukujících	Redukující sacharidy	Oranžovočervená sraženina
Benedictova reakce	Cu^{2+} v komplexu se sodnou solí citronanu, alkalické pH	Odlišení redukujících sacharidů od neredukujících	Redukující sacharidy	Oranžovočervená sraženina
Barfoedova reakce	Cu^{2+} (např. z octanu měďnatého), slabě kyselé pH	Odlišení redukujících monosacharidů od redukujících disacharidů	Redukující monosacharidy	Červená sraženina

Cíl úlohy:

1. Praktické provedení enzymového štěpení škrobu α -amylázou, demonstrace rozdílu v dostupnosti substrátu (vařený × syrový).
2. Pochopení významu α -amylázy pro štěpení sacharidů.
3. Seznámení se se základními barevnými reakcemi, které sacharidy poskytují.

Úloha 2 Stanovení aktivity α -amylázy v séru (S-AMS)

α -amyláza je trávicí enzym produkovaný především **pankreatem** a **slinnými žlázami**. Stanovení její aktivity v **séru** a **moči** patří k rutinním vyšetřením v klinicko-biochemických laboratořích. Vyšetřuje se primárně při podezření na **onemocnění pankreatu**. V této indikaci je specifitějším vyšetřením stanovení **pankreatické α -amylázy**.

Klinický význam a mechanismy změn aktivity

Při poškození **acinárních buněk pankreatu** dochází k narušení integrity buněčných membrán, což vede k nežádoucímu úniku velkého množství enzymů (včetně α -amylázy) do intersticiálního prostoru a následně do krve. U **akutní pankreatitidy** pozorujeme nárůst aktivity α -amylázy v séru již přibližně za **4 hodiny** po nástupu klinických příznaků, s dosažením vrcholu za přibližně **24 hodin**.

Dalším mechanismem, který může vést ke zvýšení aktivity α -amylázy v krvi, je **zablokování pankreatických vývodů** (například kamenem, otokem nebo nádorem). Zvýšený tlak v pankreatickém vývodu způsobuje aktivaci trávicích enzymů, které následně poškozují pankreatickou tkáň, a enzymy se uvolňují do krve.

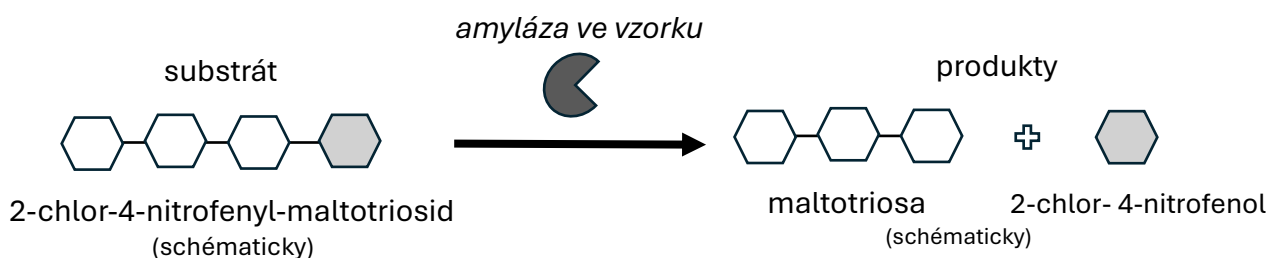
Na druhé straně, **pokročilé stadium chronické pankreatitidy** je spojeno s rozsáhlým poškozením acinárních buněk. Tyto buňky ztrácejí schopnost produkovat enzymy, což se může

projevit **sníženou aktivitou α -amylázy v krvi**, ale aktivita může být i normální. Sníženou aktivitou α -amylázy je možné pozorovat i u cystické fibrózy s vyjádřenou pankreatickou nedostatečností.

α -amyláza je vylučována především močí. Při vzestupu aktivity α -amylázy v krvi následuje s několikahodinovým zpožděním i zvýšení v moči, které přetrvává delší dobu ve srovnání s koncentracemi v krvi.

Metoda pro stanovení celkové α -amylázy

Laboratorní metody pro stanovení α -amylázy jsou založeny na **měření rychlosti**, s jakou enzym štěpí specifický substrát. V minulosti byl jako substrát používán obarvený škrob, u něhož bylo obtížné zajistit standardizaci. V naší metodě je jako specifický substrát použit **2-chlor-4-nitrofenyl-malto-triosid (CNP-G3)**. Tento substrát je štěpen amylázou na maltotriózu, která je bezbarvá, a **2-chlor-4-nitrofenol (CNP)**, jehož ionizovaná forma je žlutá a jehož absorbance se měří kineticky v čase (opakovaně v krátkých časových intervalech). Rychlost nárůstu absorbance je přímo úměrná aktivitě amylázy ve vzorku.



Referenční hodnoty celkové α -amylázy v séru: 0,37 – 1,33 $\mu\text{kat/l}$
v moči: <5,35 $\mu\text{kat/l}$

Cíl úlohy:

1. Pochopení klinického významu stanovení α -amylázy.
2. Seznámení se s metodikou stanovení aktivity α -amylázy v biologických tekutinách

Úloha 3 Enzymové štěpení disacharidů

Štěpení oligosacharidů (např. isomaltóza, maltóza, maltotrióza, laktóza, sacharóza) na jednotlivé monosacharidy (glukóza, galaktóza, fruktóza) je dokončeno působením enzymů lokalizovaných v kartáčovém lemu enterocytů.

Enzymy účastníci se trávení oligosacharidů:

- ✓ **Laktáza** – hydrolyzuje laktózu na glukózu a galaktózu.
- ✓ **Sacharázový-isomaltázový komplex** – je tvořen dvěma samostatnými funkčními podjednotkami:
 - **Sacharázová podjednotka** – štěpí sacharózu na glukózu a fruktózu a přispívá ke štěpení maltózy a maltotriózy.
 - **Isomaltázová podjednotka** – hydrolyzuje α -1,6-glykosidové vazby v isomaltóze a dextrinech a účastní se také hydrolýzy α -1,4-vazeb v maltóze a maltotrióze.
- ✓ **Trehaláza** hydrolyzuje neredukující disacharid trehalózu, která se vyskytuje např. v houbách nebo řasách.

Hlavní disacharidázy

Enzym	Substrát	Produkty	Specifika
Laktáza			
	laktóza	glukóza + galaktóza	β -1,4-glykosidové vazby
Sacharázový-isomaltázový komplex			
Sacharáza	sacharóza	glukóza + fruktóza	α -1,2'- β '-glykosidové vazby
	maltóza, maltotrióza	glukóza	α -1,4-glykosidické vazby
Izomaltáza	α -limitní dextriny	glukóza	α -1,6-glykosidové vazby
	maltóza, maltotrióza	glukóza	α -1,4-glykosidové vazby
Trehaláza			
	trehalóza	glukóza	α -1,1'- α '- glykosidové vazby trehalózy

Monosacharidy jsou poté vstřebávány do krve prostřednictvím specifických přenašečů v apikální membráně enterocytů.

Deficity disacharidáz

Při nedostatečné aktivitě disacharidáz procházejí nestrávené oligosacharidy do tlustého střeva, kde působí jako osmoticky aktivní látky – vážou vodu, což vede k průjmům. Kromě toho dochází k fermentaci střevní mikrobiotou, která produkuje plyny a další osmoticky aktivní látky (např. krátké mastné kyseliny).

Deficity disacharidáz mohou být podmíněny geneticky (např. vrozený deficit sacharázy-isomaltázy, vzácná forma vrozené laktázové deficience), nebo se rozvíjejí na podkladě poškození sliznice střev z různých příčin (např. celiakie, infekční enteritidy).

Deficience laktázy

Aktivita laktázy fyziologicky klesá s věkem, neboť mléko není pro dospělé savce přirozená potrava. U lidí ale došlo vícekrát v různých populacích k mutaci, v jejímž důsledku enzym zůstává i v dospělosti a poskytuje výhodu. Protože v anglosaské populaci tento mutovaný stav drtivě převažuje, deficit laktázy v dospělosti byl popsán jako choroba. Projevuje se gastrointestinálními příznaky po požití mléčných výrobků, které obsahují laktózu (nesnášenlivost neboli intolerance laktózy).

Cíl úlohy:

1. Seznámení se s enzymy, které se podílejí na enzymovém štěpení disacharidů (laktózy a sacharózy) v tenkém střevě
2. Pochopení významu disacharidáz v trávení sacharidů.
3. Ověření pojmu substrátové specifity enzymů.

Úloha 4 Tenkovrstvá chromatografie sacharidů

(opakování viz 3. praktika Základní vlastnosti látek)

Chromatografie patří k velmi rozšířeným fyzikálně-chemickým metodám, které se uplatňují při kvalitativní i kvantitativní analýze různých látek. Obecným principem metody je dělení směsi látek na základě jejich různé pohyblivosti **ve dvou fázích – nepohyblivé čili stacionární a pohyblivé čili mobilní**, které se od sebe odlišují některou základní fyzikálně-chemickou vlastností, např. polaritou.

Princip tenkovrstvé chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (thin-layer chromatography – TLC) je označení pro chromatografickou techniku, kde stacionární fáze je v plošném uspořádání. Rozdělení směsi látek pomocí TLC je výslednicí interakcí mezi dělenými látkami, stacionární a mobilní fází.

Stacionární fáze má obvykle polární charakter. Využívány jsou jemnozrnné adsorbenty, jako je hydratovaný oxid křemičitý (silikagel), hydratovaný oxid hlinitý nebo prášková celulóza. U komerčně dostupných desek pro TLC je adsorbent ve formě tenké vrstvičky zafixován na hliníkové nebo plastové podložce. **Mobilní fáze** je kapalina, která se pohybuje mezi částicemi pevné fáze. Vhodnou mobilní fází je rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel, v nichž se všechny složky analyzované směsi rozpouštějí.

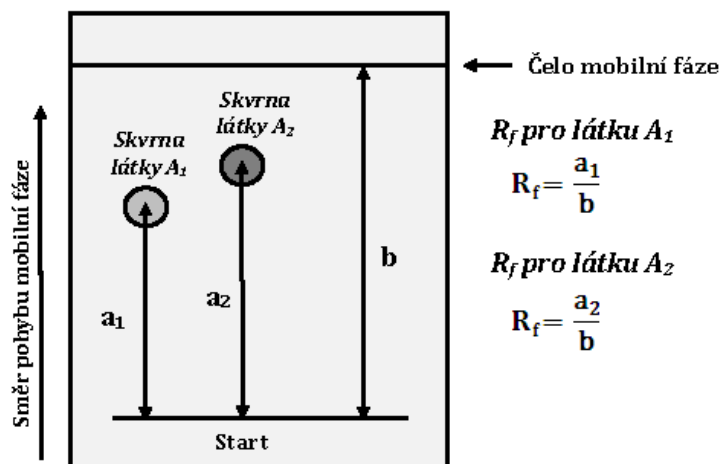
Při TLC chromatografii se látky dělí obvykle na základě svých odlišných adsorpčních vlastností k povrchu adsorbentu. Mobilní fáze vzlíná póry stacionární fáze a při tom různou rychlostí posouvá látky obsažené v analyzovaném vzorku ve směru toku mobilní fáze. Rychlost pohybu jednotlivých látek závisí na poměru jejich afinit ke stacionární a mobilní fázi. Stacionární fáze má schopnost analyzované látky různou měrou zadržovat. Látky, které se více poutají ke stacionární fázi, postupují pomaleji a po skončení chromatografického dělení zůstávají blíže startu. Naopak látky s vyšší afinitou k mobilní fázi se pohybují rychleji a doputují do větší vzdálenosti od místa nanesení.

Postup při tenkovrstvé chromatografii

- **Nanášení vzorků** – provádí se v podobě malých kulatých skvrn.
- **Vyvíjení** – probíhá v chromatografické komoře, na jejímž dně je nalita mobilní fáze. Místo, kam doputovala mobilní fáze, se označuje jako **čelo**.
- **Detekci skvrn** – pokud jsou analyzované látky barevné, je jejich poloha viditelná a detekce se nemusí provádět. K průkazu bezbarvých skvrn se využívají chemické reakce rozdělených látek s různými činidly, při nichž **vznikají barevné produkty**. Deska se činidlem buď postříká, nebo se po něho ponoří. Při použití stacionární fáze s přídavkem fluorescenčního indikátoru lze **po ozáření UV světlem** prokázat látky, které mají schopnost absorbovat ultrafialové světlo.
- **Hodnocení** – Vyhodnocení polohy skvrn se provádí pomocí tzv. **retardačního faktoru (R_f)**. Udává vzdálenost, o kterou se látka posune na dané desce při chromatografickém dělení. Vypočte se jako poměr vzdálenosti středu skvrny od startu (označena jako a) ke vzdálenosti čela mobilní fáze od startu (označena jako b)

$$R_f = \frac{\text{a – vzdálenosti středu skvrny od startu}}{\text{b – vzdálenosti čela mobilní fáze od startu}}$$

R_f je bezrozměrná veličina, která může nabývat hodnota od 0 do 1. Hodnotu rovnu 0 mají látky zůstávající na startu a hodnotu 1 látky nezadržené mobilní fází putující s čelem rozpouštědla.



R_f je charakteristický pro jednotlivé látky dělené chromatograficky za přesně definovaných podmínek (např. stejné složení mobilní a stacionární fáze, stejná teplota při vyvíjení). Pro spolehlivou identifikaci skvrn analyzovaných látek je zapotřebí na stejném chromatogramu současně s neznámým vzorkem analyzovat i **standardní čisté látky**, jejichž přítomnost v testovaném vzorku předpokládáme. Pokud standard a sledovaná látka mají stejnou hodnotu R_f a stejně reagují při detekci, jde zpravidla o totožné látky.

Tenkovrstvá chromatografie v analýze sacharidů

Sacharidy jsou látky hydrofilní povahy, což významně ovlivňuje chování při chromatografickém dělení. Hodnota R_f sacharidů je dána řadou faktorů, jako je velikost molekuly sacharidů (monosacharidy, oligosacharidy), počet uhlíků v molekule a dále počet a prostorové uspořádání hydroxylů. Větší počet hydroxylových skupin způsobuje, že dochází k výrazné interakci mezi adsorbentem a sacharidem. K detekci sacharidů je možno využít jejich vhodných barevných reakcí, které sacharidy poskytují.

Cíl úlohy:

1. Porozumění principům tenkovrstvé chromatografie a její praktické provedení – opakování
2. Použití tenkovrstvé chromatografie při separaci a identifikaci sacharidů.



Návody k úlohám

Úlohy 1 – 2

Úlohy 1 a 2 jsou věnovány α -amyláze. V úloze 1 budete pracovat s vlastní α -amylázou, která je obsažena ve slinách. V úloze 2 stanovíte katalytickou koncentraci α -amylázy v dodaném vzorku séra.

Úlohy 3 – 4

Úlohy 3 a 4 na sebe úzce navazují. Cílem je identifikovat dvě neznámé disacharidázy, označené jako – enzym A a enzym B. K jejich identifikaci použijete testování jejich substrátové specifity. V úloze 3 budete hydrolytické produkty určovat **pomocí nespecifických barevných reakcí na sacharidy**. Následně, v úloze 4, budete hydrolytické produkty blíže specifikovat **pomocí tenkovrstvé chromatografie**. Tato metoda vám upřesní jednotlivé produkty hydrolýzy. Na základě nespecifických barevných reakcí a výsledků z chromatografie pak určíte, o jaké konkrétní disacharidázy se v případě enzymu A a B jedná.

Úlohou 3 začnete provádět jako první a poté budete pokračovat úlohou 4, která je časově náročná.

Úloha 1

Enzymová hydrolýza škrobu α -amylázou

V úloze se seznámíte s funkcí α -amylázy, která se významně podílí na trávení škrobu. Budete sledovat postupnou hydrolýzu škrobu na oligosacharidy prostřednictvím reakce s Lugolovým roztokem a Benedictovým činidlem.

Úkoly:

1. Připravte naředěný Lugolův roztok a reakční směsi vařeného škrobu s vlastní α -amylázou.
2. Postupně v pravidelných časových intervalech provádějte reakci štěpeného škrobu s Lugolovým roztokem a pozorujte barevné změny.
3. Dále štěpení škrobu ověřte před hydrolýzou a po hydrolýze reakcí s Benedictovo činidlem.
4. Pokus můžete zopakovat i s použitím nevařeného škrobu.

Reagencie:

- 1) Škrobový maz 10 g/l
- 2) Nevařený škrob 10 g/l
- 3) Lugolův roztok: (roztok jódu 3 g/l v roztoku jodidu draselného 50 g/l  )
- 4) Benedictovo činidlo: ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 17,3 g se rozpustí asi ve 100 ml čištěné vody. Na_2CO_3 100 g a citronan sodný 173 g se rozpustí asi v 700 ml čištěné vody. Oba roztoky se smísí a objem se doplní čištěnou vodou do 1 l  )
- 5) Vlastní sliny (obsahují α -amylázu)

Pracovní postup:

Sběr vlastních slin

Vypláchněte si ústa vodou. Do kádinky sesbírejte cca 4 ml slin.

Naředění Lugolova roztoku

- a) Do 30 ml čištěné vody přikápněte 10 kapek Lugolova roztoku.

Enzymová hydrolýza škrobového mazu

- a) Připravte 2 kontrolní zkumavky a označte je 1K (kontrolní zkumavka 1) a 2K (kontrolní zkumavka 2). Dále připravte dalších 8 zkumavek a označte je 1A – 8A (viz tabulka v protokolu). Do všech zkumavek odměřte po 1 ml zředěného Lugolova roztoku.
- b) Do zkumavky 1K přidejte kapku škrobového mazu, do zkumavky 2K 2 kapky neředěné sliny, promíchejte a odečtěte výsledek.
- c) Do nádobky připravte 10 ml škrobového mazu a přidejte 1 ml neředěných slin. Dobře promíchejte. Vložte do termobloku temperovaného na 37 °C.
- d) Po 30 s odeberte kapátkem 2 kapky zahříváného škrobového mazu se slinami a přidejte do zkumavky s Lugolovým roztokem 1A. Před odběrem škrobový maz v nádobce promíchejte. Opakujte každých 30 s až do té doby, kdy po reakci s Lugolovým roztokem nevzniká žádné zbarvení. Pokud hydrolýza proběhla příliš rychle a nezachytili jste barevný přechod při reakci s Lugolovým roztokem, opakujte pokus se slinami naředěnými čištěnou vodou (1 díl slin a 1 díl čištěné vody).

- e) Se samotným škrobovým mazem a hydrolyzátem škrobu proveďte Benedictovu reakci. Do 2 zkumavek odměřte po cca 1 ml Benedictova činidla a přikápněte několik kapek škrobového mazu nebo hydrolyzátu škrobu. Obsah ve zkumavkách promíchejte a vložte do vroucí vodní lázně. Po 3–4 minutách odečtěte výsledek. Hodnoťte změnu zbarvení a vznik sraženiny.
- f) Výsledky zaznamenávejte do tabulky v protokolu.

Enzymová hydrolýza nevařeného škrobu (nepovinné)

- a) Připravte si kontrolní zkumavku a označte ji K (kontrolní zkumavka 1). Dále si připravte další zkumavky a označte je 1B – 8B (viz tabulka v protokolu). Do všech zkumavek odměřte po 1 ml zředěného Lugolova roztoku.
 - b) Do zkumavky K přidejte kapku škrobového mazu a odečtěte výsledek.
 - c) Do nádobky připravte 10 ml suspenze nevařeného škrobu a 1 ml neředěných slin. Dobře promíchejte. Vložte do termobloku temperovaného na 37 °C.
 - d) Po 30 s odeberte kapátkem 2 kapky suspenze škrobu a přidejte do zkumavky s Lugolovým roztokem 1B. Opakujte každých 30 s po dobu 4 minut. Před každým odběrem suspenze škrobu dobře promíchejte. Modře zbarvená zrnka škrobu jsou dobře viditelná po usazení na dně zkumavky.
 - e) Po skončení čtyřminutové inkubace odeberte z nádobky vzorek a proveďte s ním Benedictovu reakci.
 - f) Výsledky zaznamenávejte do tabulky.
-

Úloha 2 Stanovení aktivity α -amylázy v séru (S-AMS)

V úloze se seznámíte s α -amylázou jako biomarkerem poškození pankreatu a jednou z metod, která se používá pro její stanovení v biologických tekutinách (obvykle v séru/plazmě, popř. moči).

Úkoly:

1. Ve vzorku séra stanovte aktivitu α -amylázy.
2. Srovnáním s referenčními hodnotami vyhodnoťte zjištěnou aktivitu α -amylázy.

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava α -amylase-EPS (BioSystems)

1. Pracovní činidlo:

MES 50 mmol/l, chlorid vápenatý 5 mmol/L, chlorid sodný 300 mmol/L, rhodanid sodný 450 mmol/L, 2-chlor-4-nitrofenyl-malto-triosid 2,25 mmol/l, pH 6,1

2. Sérum – neznámý vzorek

Pracovní postup:

- a) Pracovní činidlo a kyvetu předehřívejte 5 minut na 37 °C.
- b) Připravte spektrofotometr k měření nastavením vlnové délky 405 nm. Absorbance se měří proti čištěné vodě.
- c) Do kyvety připravte reakční směs podle tabulky:

Odměřte v ml do kyvety:	Vzorek
Pracovní činidlo	1,00
Vzorek	0,030

- d) Promíchejte a vložte kyvetu do spektrofotometru. Spusťte stopky.
- e) Zaznamenejte počáteční absorbanci a pokračujte v zaznamenávání v minutových intervalech po dobu 3 minut.
- f) Vypočítejte rozdíl mezi po sobě jdoucími absorbancemi a průměrný rozdíl absorbancí za minutu ($\Delta A/\text{min}$).

Úloha 3 Enzymové štěpení disacharidů

V úloze budou určovány dvě disacharidázy, enzymy, které štěpí disacharidy obsažené v potravě. K určení těchto disacharidáz bude využita jejich substrátová specifita.

Úkoly:

1. Připravte reakční směsi obsahující pro každou disacharidázu (enzym A a enzym B) různé disacharidy jako substráty.
2. Redukčními zkouškami Benedictovou a Barfoedovou reakcí určete, zda v reakční směsi je přítomen redukující monosacharid nebo disacharid.
3. Vyhodnoťte, v kterých reakčních směsích proběhla hydrolyza substrátu.

Reagencie:

- 1) Laktóza 10 g/l
- 2) Sacharóza 10 g/l (roztok denně čerstvý)
- 3) Enzym A
- 4) Enzym B
- 5) Benedictovo činidlo: viz úloha 1  
- 6) Barfoedovo činidlo:
(13,3 g krystalického octanu měďnatého rozpustíte v 200 ml destilované vody, přefiltrujete a přidejte 1,8 ml ledové kyseliny octové     )

Pracovní postup:

- a) Očísľujte 4 dlouhé zkumavky a smíchejte v nich reakční směsi dle tabulky:

	ZKUMAVKA 1	ZKUMAVKA 2	ZKUMAVKA 3	ZKUMAVKA 4
Sacharóza	2 ml	2 ml	–	–
Laktóza	–	–	2 ml	2 ml
Enzym A	2 ml	–	2 ml	–
Enzym B	–	2 ml	–	2 ml

- b) Zkumavky vložte na 30 minut do termobloků temperovaných na 37 °C.

Průkaz enzymového štěpení substrátů

- a) Pomocí **Benedictovy reakce** určete, ve kterých zkumavkách proběhlo štěpení substrátu za vzniku redukujícího sacharidu. Postupujte následujícím způsobem: Do 4 nových zkumavek odměřte po cca 1 ml Benedictova činidla. Do těchto zkumavek přikápněte několik kapek reakčních směsí z původních zkumavek. Obsah ve zkumavkách promíchejte a vložte do vroucí vodní lázně. Po 3–4 minutách odečtěte výsledek. Hodnoťte změnu zbarvení a vznik sraženiny.
- b) Pomocí **Barfoedovy reakce** určete, zda proběhlo štěpení substrátu za vzniku redukujících monosacharidů. Do zkumavek připravte po 1 ml Barfoedova činidla a přidejte po 0,5 ml reakčních směsí z původních zkumavek. Zkumavky vložte do vroucí vodní lázně. Po 2–3 minutách odečtěte výsledek.
- c) Pomocí TLC identifikujte konkrétní monosacharidy vzniklé při štěpení disacharidázami – viz další úloha.

Úloha 4 Tenkovrstvá chromatografie sacharidů

Pomocí tenkovrstvé chromatografie prokážete produkty hydrolýzy disacharidů, kterou jste prováděli v předchozí úloze. Výsledky použijete k identifikaci disacharidáz A a B.

Úkoly:

1. Podle návodu níže připravte vyvíjecí směs, naneste do startů produkty hydrolýzy a příslušné standardy, nechte proběhnout vyvíjení a poté proveďte detekci skvrn
2. Vyhodnoťte detekované skvrny a určete, o jaké se jedná sacharidy.
3. Na základě průkazu hydrolytických produktů určete, o jaké disacharidázy se jednalo.

Reagencie:

a) Vzorčky:

Standardy – vodné roztoky galaktózy, glukózy, fruktózy, laktózy a sacharózy 5 g/l

b) Ethylacetát  

c) Isopropanol  

d) Difenylamin   

e) Anilin    

f) Kyselina fosforečná 85 % 

g) Aceton  

Detekční činidlo:

4 g difenylaminu, 4 ml anilinu a 20 ml 85 % kyseliny fosforečné se rozpustí ve 200 ml acetonu.

Pracovní postup:

1. Příprava vyvíjecí směsi

Do chromatografické komory odměřte 15 ml ethylacetátu, 12 ml isopropanolu a 3 ml čištěné vody, uzavřete ji a promíchejte. Komoru nechte asi 15 minut sytit. Bude již připraveno.

2. Příprava desky a nanášení vzorků

Na desku Silufolu vyznačte tužkou asi 1,5 cm od dolního okraje 6 bodů nanášek (starty). Vzdálenost mezi nimi je asi 1 cm. Na horním okraji desky nad příslušnými starty označte kódy nanášených látek. Do pravého horního rohu desky uveďte své iniciály.

Dále se studenti rozdělí do dvojic a každá dvojice připraví desku s různými nanáškami.

Deska 1

Do 3 označených startů naneste asi 3 μ l standardních roztoků fruktózy, glukózy a sacharózy, do 4. a 5. startu vzorky ze zk. 1 a 2 předchozí úlohy). Velikost nanášek by neměla překročit 0,5 cm. Starty necháme dobře oschnout.

Deska 2:

Do 3 označených startů nanášíme asi 3 μ l standardních roztoků galaktózy, glukózy a laktózy, do 4. a 5. startu vzorky ze zk. 3 a 4 z předchozí úlohy.

3. Vyvíjení

Desku opatrně vložte do chromatografické komory s připravenou vyvíjecí směsí a ihned uzavřete. Starty nesmějí být ponořeny. Chromatogramy nechte vyvíjet minimálně 1 hodinu, optimálně 1,5 hodiny. Poté desku vyjměte a vysušte v sušárně vyhřáté na 85 °C.

4. Detekce

Vysušenou desku postříkejte detekčním činidlem a pak vložte opět na 5 minut do vyhřáté sušárny. Po zahřátí vystoupí barevné skvrny cukrů. Detekci provádějte v zapnuté digestoři.

V laboratoři nesmí hořet otevřený plamen!



Závěr

Vraťme se k obtížím studentky Jany. Její problémy s nadýmáním, plynatostí a průjmy po sacharidech mohou mít více příčin. Jedním směrem, kterým je možné se ubírat při diagnostické rozvaze, je posouzení, zda není porušena funkce některého z enzymů podílejících se na trávení sacharidů.

- **Nedostatečná funkce pankreatu:** Pokud by příznaky Jany byly způsobeny narušenou funkcí pankreatu, diagnózu by mohlo podpořit zjištění snížené aktivity α -amylázy v séru, ale samotné vyšetření je nedostatečné. S metodikou stanovení tohoto enzymu jste se seznámili.
- **Deficit laktázy:** Pokud je snížena aktivita laktázy, jednalo by se nejspíše o intoleranci laktózy. Ta by vysvětlovala přítomnost příznaků po konzumaci mléka. Laktóza však může být přítomna i v menším množství v některém pečivu nebo hotových potravinách.
Pro průkaz nedostatečné aktivity laktázy existují pokročilejší testy. Jedním z nich je dechový test. Pacient vypije mléčný nápoj obsahující definované množství laktózy. V jeho dechu se poté měří koncentrace vodíku. Její zvýšení svědčí pro fermentaci nestrávené laktózy střevní mikrobiotou.
- **Nedostatek sacharázy:** Snížená aktivita sacharázy se může vyskytnout sekundárně např. po prodělané enteritidě. Pacienti špatně snášejí stolní cukr (sacharózu).



Na podrobnější diferenciální diagnostiku poruch trávení nejen sacharidů, což však nebylo náplní praktik, se můžete těšit ve vyšších ročnících studia.



Použitá a doporučená literatura

1. ABALI, Emine Ercikan; CLINE, Susan D.; FRANKLIN, David S. a VISELLI, Susan. *Lippincott's illustrated reviews: biochemistry*. Eighth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2022. ISBN 978-1-975155-11-7.
2. FIALOVÁ, Lenka. Lékařská chemie a biochemie pro stomatology: praktická cvičení - teoretická část. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-2890-5.
3. MURRAY, Robert K.; BENDER, David A.; BOTHAM, Kathleen M.; KENNELLY, Peter J.; RODWELL, Victor W. et al. Harperova ilustrovaná biochemie. Páté české vydání, první v nakladatelství Galén. Praha: Galén, 2012. ISBN 978-80-7262-907-7.
4. KRAML, Jiří a UNIVERZITA KARLOVA. LÉKAŘSKÁ FAKULTA, 1. Ústav lékařské chemie a biochemie. Návod k praktickým cvičením z lékařské chemie a biochemie. 2. vyd. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-246-0020-X.
5. LETURQUE, A., and BROT-LAROCHE, E. Digestion and Absorption of Carbohydrate. Online. Dostupné na: <https://basicmedicalkey.com/digestion-and-absorption-of-carbohydrate/> [citováno 2025-06-15].

Nástroje umělé inteligence

- OpenAI. (2025). *ChatGPT* (verze o4). <https://chat.openai.com/>
- Google. (2025). *Gemini* (Verze z června 2025) [Velký jazykový model].

Obrázky

- Autor Lenka Fialová: str. 4, 5, 8, 11
- Google. (2025). *Gemini* (Verze z června 2025) ostatní obrázky