

TÉMA	ENZÝMY
Úloha 25:	Časový priebeh enzýmom katalyzovanej reakcie: štiepenie želatíny trypsínom
Princíp:	<p><i>Trypsín (EC 3.4.21.4) má molekulovú hmotnosť 24 000 g/mol. Patrí medzi hydrolázy, ktorého pH optimum je 7 až 9, teda slabo alkalické prostredie. Pôsobí na peptidové väzby susediace s lyzylovými a arginylovými aminokyselinovými zvyškami peptidového reťazca (Lys – X, Arg – X):</i></p> $ \begin{array}{c} R_1 - \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH} - R_2 \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{NH} \qquad \qquad \qquad \text{CO} \\ \vdots \qquad \qquad \qquad \vdots \end{array} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \begin{array}{c} R_1 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH} \\ \vdots \end{array} + \begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} - \text{CH} - R_2 \\ \\ \text{CO} \\ \vdots \end{array} $ <p><i>Pri tejto hydrolyze sa uvoľňujú karboxylové skupiny (–COOH), ktoré možno stanoviť formolovou titráciou podľa Sørensen. Štiepenie prebieha v alkalickom prostredí pri 38 °C. Zastavuje sa prídavkom formaldehydu, ktorý inaktivuje enzým. Stanovením karboxylových skupín uvoľnených za rôzny čas pôsobením enzýmu možno sledovať časový priebeh reakcie.</i></p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. 5 % roztok želatíny 2. 2 % roztok trypsínu (denne čerstvý, uchovávaný v chladničke) 3. 0,05 M roztok hydroxidu sodného 4. zneutralizovaný 4 % roztok formaldehydu (niekoľko kvapiek fenolftaleínu + NaOH do slaboružového sfarbenia – 320 ml H₂O + 40 ml 36 % formaldehydu) 5. 0,1 % etanolový roztok fenolftaleínu (farebný prechod pri pH 8,2 – 9,8)
Materiál:	Erlenmayerove banky s objemom 100 ml (7 ks), sklenené pipety s nadstavcom, termostat, byreta s objemom 25 ml
Postup:	<p>Do siedmich označených Erlenmayerových baniek s objemom 100 ml odpipetujeme po 10 ml roztoku želatíny (substrát) a pridáme po 4 kvapky fenolftaleínu. Roztoky zneutralizujeme prídavkom 0,05 M NaOH do rovnakého svetloružového sfarbenia vo všetkých bankách (pridáme rovnaký objem NaOH, napr. po 3 ml). Potom banky i skúmavku s trypsínom (enzým) vložíme do termostatu vyhriateho na teplotu 38 °C. Reagencie inkubujeme približne 10 min.</p> <p>Po uplynutí 10 min vyberieme prvú banku, do ktorej z pipety rýchlo pridáme 0,25 ml roztoku trypsínu, zmes premiešame, zaznamenáme čas a dáme späť do termostatu. Počas štiepenia želatíny trypsínom, zmes stráca pôvodné ružové sfarbenie v dôsledku tvorby kyslých α-COOH skupín, ktoré znižujú pH (roztok fenolftaleínu je pri kyslom pH bezfarebný). Presne po 1 min vyberieme z termostatu prvú banku a do zmesi pridáme 2,5 ml roztoku formaldehydu, ktorý reakciu zastaví. Obsah banky premiešame a titrujeme 0,05 M NaOH do svetloružového sfarbenia. Takto stanovíme obsah α-COOH skupín v čase t₁ = 1 min.</p> <p>Podobným spôsobom urobíme stanovenia pre časy 3, 5, 10, 20, 30 a 45 min a zaznamenáme príslušné spotreby NaOH.</p>
Vyhodnotenie:	Spotreby NaOH (os y) pre jednotlivé časy vynesieme do grafu oproti času (os x) a takto získanými bodmi preložíme krivku.