

TÉMA	ENZÝMY				
Úloha 27:	Štiepenie bielkovín pepsínom				
Princíp:	<p><i>Pepsín (EC 3.4.23.1) je hlavný proteolytický enzým žalúdočnej šťavy ($M_r = 34\ 000$ g/mol). Jeho aktivita je najvyššia v kyslom prostredí (pH optimum 1,3 – 2,5). Štiepi bielkoviny vnútri peptidového reťazca (endopeptidáza), prednostne väzby aromatických (Phe, Tyr) aminokyselín. Výsledkom je zmes peptidov s molekulovou hmotnosťou 600 až 3 000 g/mol, označovaná aj ako peptóny (používajú sa napr. na prípravu bakteriálnych pôd).</i></p> <p><i>Účinok pepsínu budeme demonštrovať na mliečnej bielkovine kazeín, ktorý sa bežne vyskytuje vo forme micel dispergovaných v mlieku (tejto forme sa zastarane hovorí kazeinogen). Jeho vyzrážaná (koagulovaná) forma (známa aj ako parakazeín), ktorá je hlavnou zložkou mliečnych výrobkov – tvarohu a syrov, vzniká účinkom chymozínu (enzýmu nachádzajúceho sa v žalúdku cicavcov). Pôsobením pepsínu sa kazeín postupne štiepi na menšie peptidy, ktoré sa stávajú rozpustnými. Tie je možné v roztoku dokázať pomocou biuretovej a ninhydrínovej reakcie. Pepsín nebude účinkovať po jeho povarení (denaturácia teplom) ani v alkalickom prostredí.</i></p>				
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. malý kúsok (0,5 g) suchého tvarohu 2. roztok pepsínu (2 % v 0,1 M kyseline chlorovodíkovej) 3. 1 % roztok hydroxidu sodného 4. 0,1 M roztok kyseliny chlorovodíkovej 5. biuretové činidlo 6. ninhydrínové činidlo 				
Materiál:	sklenené pipety s nadstavcom, skúmavky, stojan na skúmavky, filtračný lievik, skladaný filter, termostat, laboratórna trepačka, varič, hrniec s vodou				
Postup:	Do označených skúmaviek pipetujeme roztoky podľa tabuľky 4.4 .				
TABUĽKA 4.4					
		1	2	3	4
roztok pepsínu	[ml]	–	3	3	3
0,1 M roztok HCl	[ml]	3	–	3	3
					10 min povariť, ochladiť
1 % roztok NaOH	[ml]	–	3	–	–
destilovaná H ₂ O	[ml]	3	–	–	–
	Do každej skúmavky vložíme malý kúsok tvarohu (kazeín). Všetky skúmavky inkubujeme v termostate pri 38 °C po dobu 30 minút. Po tomto čase vizuálne vyhodnotíme zmeny v skúmavkách. Nakoniec obsah všetkých skúmaviek prefiltrujeme a s jednotlivými filtrátmi urobíme biuretovú a ninhydrínovú reakciu. (Postup: viď úloha 1)				
Vyhodnotenie:	Zaznamenáme a vysvetlíme sfarbenia v jednotlivých skúmavkách.				