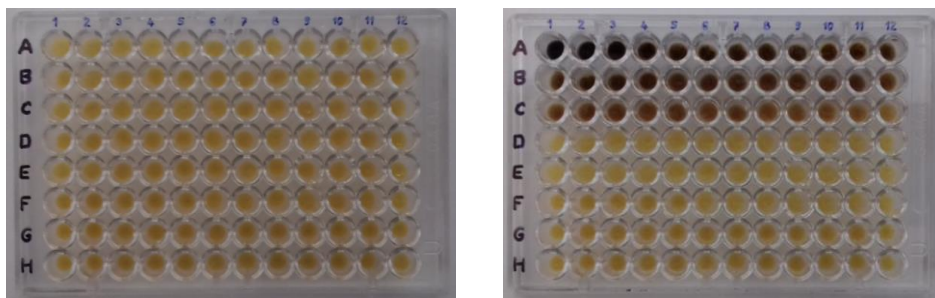


TÉMA	ENZÝMY					
Úloha 28:	Vplyv pH na aktivitu α-amylázy					
Princíp:	<p>Enzým α-amyláza (EC 3.2.1.1), ktorý sa nachádza v slinách, hydrolyticky štiepi 1,4-α-D-glykozidové väzby škrobu a podobných polysacharidov za vzniku maltózy, maltotriózy a rozvetvených oligosacharidov. Priebeh tejto reakcie možno sledovať pomocou jódu. Intenzívne modré sfarbenie s jódom, ktorú dáva amyláza je výsledkom javu, pri ktorom sa molekula jódu dostáva do dutín vytvorených glukózovými jednotkami a vo forme klatrátu javí silnú absorpciu svetla. Spôsobom účinku sa α-amyláza podobá endopeptidázam, to znamená, že štiepi makromolekulu škrobu vo vnútri reťazca. Prvými štiepnymi produktmi sú oligosacharidy, ktoré sa až po dlhšom pôsobení enzýmu odbúravajú na maltózu a maltotriózu (tie s jódom nereagujú). Amyláza je inhibovaná jódom, a preto sa ním nesmie inkubovaná zmes znečistiť. Recipročná hodnota času ($1/t$), ktorý je potrebný na úplné rozštiepenie škrobu, môže slúžiť ako miera aktivity enzýmu. Aktivita enzýmov veľmi závisí od koncentrácie vodíkových iónov. Ak sa reakcia uskutoční v tlmivých roztokoch s rôznymi pH, potom možno zistiť najvýhodnejšiu hodnotu pH pre aktivitu enzýmu, tzv. optimum pH.</p>					
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1 % roztok škrobu 0,2 M roztok chloridu sodného 0,1 M fosforečnanové tlmivé roztoky s pH 5,8; 6,7; 7,1; 7,4 a 7,8 roztok α-amylázy (0,1 g/10 ml, pripravený pred cvičením) 0,02 M roztok jódu 					
Materiál:	sklenené pipety s nastavcom, skúmavky, stojan na skúmavky, stopky, 96-jamkové platničky, mikropipety, sklenené trubičky na odoberanie vzoriek, trepačka					
Postup:	<p>Určenie optimálneho pH pre štiepenie škrobu α-amylázou Do označených skúmaviek pipetujeme roztoky podľa tabuľky 4.5.</p>					
TABUĽKA 4.5		1	2	3	4	5
pH		5,8	6,7	7,1	7,4	7,8
1 % škrob	[ml]	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
0,2 M NaCl	[ml]	1	1	1	1	1
tlmivý roztok	[ml]	1	1	1	1	1
premiešať						
t	[min]					
1/t	[min ⁻¹]					
<p>Ďalej pracujeme s každým roztokom zvlášť. Najprv si do 96-jamkovej platničky rozpipetujeme 0,02 M roztok jódu (20 μl do každej jamky). Potom do prvej skúmavky pridáme 0,3 ml roztoku enzýmu, zamiešame a zaznamenáme čas začiatku reakcie. Po prvej minúte odoberieme zo skúmavky (mikropipetou alebo sklenenou trubičkou) vzorku reakčnej zmesi a kvapneme ju do prvej jamky s roztokom jódu. Ak sa roztok sfarbí, znamená to, že štiepenie škrobu nebolo úplné a proces odoberania vzorky z reakčnej zmesi opakujeme. V prípade potreby (s blížiacim sa koncom reakcie), skrátime časový interval pre odoberanie vzoriek na 30 až 15 sekúnd. Opakujeme, až kým sa jód prestane farbiť. Takto zistíme celkový čas potrebný na úplné rozštiepenie škrobu, a teda ukončenie reakcie. Analogicky postupujeme aj s roztokmi v ďalších skúmavkách (vždy po jednej).</p>						



Obrázok 4.6 Vľavo: 96-jamková platnička s jamkami obsahujúcimi 0,02 M roztok jódu pripravená na detekciu škrobu. Vpravo: jamky A1 až C12 boli použité na monitorovanie priebehu štiepenia škrobu α -amylázou. Sfarbenia od tmavomodrej až po svetlohnedú svedčia o pozitívnej reakcii.

Vyhodnotenie: Recipročné hodnoty času (os y) naniesieme na graf oproti pH (os x) a získanými bodmi preložíme krivku, z ktorej odčítame pH optimum.

Záver: Uvedieme optimálne pH pre α -amylázu.

Úloha 29: *Substrátová špecificita glykozidáz: sacharózy a α -amylázy*

Reagencie:

- 1 % roztoky: sacharózy, škrobu a glukózy
- roztok sacharózy (vyizolovaná v **úlohe 21**)
- roztok α -amylázy (0,1 g/10 ml, pripravený pred cvičením)
- Benediktioho činidlo** (100 g Na_2CO_3 a 173 g citranu sodného rozpustíme v 700 ml destilovanej vody. Po ochladení pridáme 13,7 g CuSO_4 rozpusteného v 100 ml vody a doplníme destilovanou vodou do 1000 ml.)
- 0,02 M roztok jódu

Materiál: skúmavky, stojan na skúmavky, mikropipety, vodný kúpeľ, laboratórna trepačka

Postup: Do označených skúmaviiek pipetujeme roztoky podľa **tabuľky 4.6** a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených.

TABUĽKA 4.6	1	2	3	4	5	6	7	8
1 % sacharóza [ml]	1	1	–	–	–	–	–	–
1 % škrob [ml]	–	–	1	1	–	–	1	1
1 % glukóza [ml]	–	–	–	–	1	1	–	–
sacharáza [ml]	0,5	–	0,5	–	–	–	–	–
amyláza [ml]	–	0,5	–	0,5	–	–	–	–
	premiešať, 15 min inkubovať pri laboratórnej teplote							
Benediktioho činidlo [ml]	2	2	–	–	2	–	2	–
0,02 M jód	–	–	2 kv.	2 kv.	–	2 kv.	–	2 kv.
15 min vodný kúpeľ pri 100 °C	áno	áno	nie	nie	áno	nie	áno	nie

Vyhodnotenie: Zaznamenáme a vysvetlíme sfarbenia v jednotlivých skúmavkách.