

UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



Praktické cvičenia z biochémie

Erik Sedlák, Rastislav Varhač, Patrik Danko,
Helena Paulíková, Dušan Podhradský

Košice 2020

Praktické cvičenia z biochémie

Vysokoškolský učebný text

Autori:

doc. RNDr. Erik Sedlák, DrSc., *Technologický a inovačný park UPJŠ v Košiciach.*

RNDr. Rastislav Varhač, PhD., *Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach*

RNDr. Patrik Danko, PhD, *Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach*

doc. RNDr. Helena Paulíková, CSc., *Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach*

prof. Ing. Dušan Podhradský, DrSc., *Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach*

Recenzenti:

doc. RNDr. Jozef Hatok, PhD.

Jesseniova lekárska fakulta UK v Martine

doc. MVDr. Zuzana Kostecká, PhD.

Univerzita veterinárneho lekárstva a farmácie v Košiciach

Za odbornú a jazykovú stránku publikácie zodpovedajú autori. Rukopis neprešiel redakčnou ani jazykovou úpravou.

Tento text je publikovaný pod licenciou Creative Commons 4.0 - Attribution CC BY NC SA
Creative Commons Attribution - NonCommercial- ShareAlike 4.0 (“Uveďte pôvod -
Nepoužívajte komerčne - Zachovajte licenciu”)



Umiestnenie: www.unibook.upjs.sk

Dostupné od: 14.10.2020

ISBN 978-80-8152-902-3 (e-publikácia)

Predslov

Predkladané skriptá vznikli v snahe aktualizovať a predovšetkým sprehľadniť úlohy, ktoré riešia v rámci základných praktických cvičení z biochémie študenti 2. a 3. ročníka bakalárskeho stupňa štúdia odborov chémia, biológia a ich kombinácií s inými odbormi. Väčšina úloh pochádza z pôvodných skript "Podhradský, Mihalovová: *Praktické cvičenia z biochémie, Košice 1989*". Niektoré z nich boli z väčšej alebo menšej časti modifikované a prispôbené súčasným podmienkam v laboratóriu. Pribudli aj nové úlohy ako napr. tie, venované nukleovým kyselinám. Skriptá sú tematicky rozdelené do šiestich samostatných celkov, pričom každý z nich pozostáva z niekoľkých úloh. Názvy celkov odpovedajú povahe biomakromolekúl, ktoré tvoria ich ústrednú tému. Teoretické úvody na začiatku celkov sú novozostavené a ich hlavným cieľom je priblížiť stručný prehľad základných biochemických metód, ktoré sa využívajú pri štúdiu daných biomakromolekúl.

Tieto skriptá sú zámerne prístupné iba v elektronickej podobe. Dôvodom je snaha priebežne aktualizovať a modernizovať jednotlivé úlohy podľa meniacich sa možností nášho laboratória. Dúfame, že skriptá splnia svoju úlohu a študenti budú mať po absolvovaní týchto laboratórnych cvičení dostatočné teoretické vedomosti a praktické zručnosti z oblasti základných biochemických metód.

Na záver by sme chceli podporiť kritickosť študentov, ktorí budú s týmito skriptami pracovať. Autori budú vďační za každú konštruktívnu kritiku a každý návrh na zlepšenie predkladaných učebných textov.

V mene autorov

Erik Sedlák

Košice

2020

PodĎakovanie

Kolektív autorov touto cestou ďakuje pani Márii Drotárovej za pomoc s grafickou úpravou textu a technickou realizáciou úloh.

OBSAH

Pracovný poriadok a zásady bezpečnosti práce v biochemickom laboratóriu	6
Organizácia cvičenia	6
Všeobecné pravidlá	7
Základné zásady poskytovania prvej pomoci	8
Materiály v chemickom laboratóriu	11
Chemikálie	15
1 BIELKOVINY	19
Úloha 1: Reakcie na dôkaz aminokyselín a bielkovín	40
Úloha 2: Izolácia kazeínu z mlieka	45
Úloha 3: Stanovenie koncentrácie bielkoviny Lowryho metódou	45
Úloha 4: Stanovenie izoelektrického bodu ľudského albumínu	47
Úloha 5: Frakcionácia bielkovín vaječného bielka	48
Úloha 6: Dialýza bielkovín	49
Úloha 7: Stanovenie koncentrácie bielkovín biuretovou metódou	49
Úloha 8: Kvalitatívna analýza aminokyselín papierovou chromatografiou	51
2 LIPIDY	52
Úloha 9: Izolácia fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolamínu zo žĺtka	66
Úloha 10: Stanovenie jódového čísla tukov Yasudovou metódou	68
Úloha 11: Stanovenie čísla zmydelnenia tukov	70
Úloha 12: Stanovenie koncentrácie cholesterolu	71
Úloha 13: Dôkaz cholesterolu: Salkowského reakcia	72
Úloha 14: Výroba mydla	73
Úloha 15: Reakcie s mydlom	73
Úloha 16: Oxidácia nenasýtených mastných kyselín	74
3 SACHARIDY	75
Úloha 17: Reakcie na dôkaz sacharidov	88
Úloha 18: Stanovenie redukujúcich sacharidov Schoorlovou metódou	92
Úloha 19: Kvalitatívna analýza sacharidov tenkovrstvovou chromatografiou	94
Úloha 20: Stanovenie redukujúcich a neredukujúcich sacharidov v klíčiach rastlín	95
Úloha 21: Izolácia kvasinkovej sacharázy	98
Úloha 22: Stanovenie koncentrácie sacharázy Lowryho metódou	98
Úloha 23: Stanovenie aktivity sacharázy na základe redukujúcich sacharidov	99
Úloha 24: Vplyv pH na aktivitu sacharázy	102
4 ENZÝMY	103
Úloha 25: Časový priebeh enzýmom katalyzovanej reakcie: štiepenie želatíny trypsinom	118
Úloha 26: Stanovenie aktivity katalázy	119
Úloha 27: Štiepenie bielkovín pepsinom	121

Úloha 28: Vplyv pH na aktivitu α -amylázy	122
Úloha 29: Substrátová špecificita glykozidáz: sacharázy a α -amylázy	123
Úloha 30: Vplyv koncentrácie substrátu na počiatočnú rýchlosť reakcie: určenie V_{\max} a K_m pre štiepenie močoviny ureázou	124
5 NUKLEOVÉ KYSELINY	128
Úloha 31: Izolácia DNA zo sleziny	137
Úloha 32: Izolácia RNA z droždia	137
Úloha 33: Dôkaz zložiek DNA	137
Úloha 34: Dôkaz zložiek RNA	138
Úloha 35: Mikropreparatívna izolácia plazmidovej DNA	139
Úloha 36: Elektroforéza nukleových kyselín	140
Úloha 37: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty nukleových kyselín	140
Úloha 38: Teplotná stabilita nukleových kyselín	141
6 VITAMÍNY	142
Úloha 39: Stanovenie koncentrácie vitamínu C 2,4-dinitrofenylhydrazínom	151
Úloha 40: Dôkaz vitamínu A	152
Úloha 41: Dôkaz vitamínu B ₁	152
Úloha 42: Dôkaz vitamínu C	153

PRACOVNÝ PORIADOK A ZÁSADY BEZPEČNOSTI PRÁCE V BIOCHEMICKOM LABORATÓRIU

Organizácia cvičenia

V laboratóriu pracujú študenti samostatne alebo po dvoch až štyroch v skupine a robia pridelené práce v poradí, ktoré im určil vedúci cvičenia. Dodržanie harmonogramu prác je nevyhnutné vzhľadom na obmedzený počet prístrojov.

Študenti sú povinní:

1. Prísť na cvičenie včas a zostať v laboratóriu až do skončenia. Zmeškanie viac ako 15 minút sa neospravedlní a úloha sa musí odcvičiť v náhradnom cvičení.
2. Na cvičenie sa pripraviť vopred a poznať pracovný postup. Poslucháči musia byť pripravení tak, aby účelne využili čas. Ak vedúci cvičenia zistí, že sa študent na úlohu nepripravil, musí laboratórium opustiť a s vedúcim si dohodne náhradný termín.
3. Každá absencia musí byť ospravedlnená písomne. Ak má študent závažné osobné dôvody, pre ktoré nebude možné zúčastniť sa na budúcom cvičení, ohlásí to vedúcemu vopred. Každá zameškaná úloha sa musí nahradiť. Na termíne náhradného cvičenia sa dohodne študent s vedúcim. Tento termín je rovnako záväzný ako termín riadneho cvičenia. Maximálny počet náhradných cvičení je 2 (výnimočne možno prekročiť, ak bola absencia zavinená chorobou).
4. Študenti sú povinní udržiavať v laboratóriu poriadok. Pred začatím cvičenia skontrolujú, či majú na stole úplné vybavenie. Nie je dovolené prenášať vybavenie od jedného stola k druhému. Po skončení cvičenia dá študent všetko do pôvodného stavu a len potom ohlásí vedúcemu cvičenia, že prácu skončil.
5. Študenti majú pracovný zošit (nie kúsok papiera), do ktorého v priebehu cvičenia zapisujú vlastné pozorovania, výsledky, hodnoty merania a pod. Po skončení úlohy predložia vedúcemu cvičenia tieto poznámky s výsledkami svojej práce a potom vypracujú protokol.
6. Na nasledujúcom cvičení odovzdávajú protokol o práci minulého cvičenia. Protokol (obvyčajne dvojhárok) má na titulnej strane názov a číslo úlohy (v strede), meno poslucháča, za menom číslo krúžku a dátum cvičenia (v pravom dolnom rohu). Protokol sa robí z každej úlohy a musí obsahovať:
 - a) stručný princíp úlohy, spočívajúci predovšetkým v chemickej rovnici, prípadne schematického znázornenia sledovaného deja,
 - b) stručný pracovný postup (neopisovať z návodov na cvičenie!), uviesť len úpravy počas pracovného postupu (riedenie vzorky, množstvo vzorky použité pri práci),
 - c) namerané hodnoty (ktoré sú základom protokolu), grafy, tabuľky,
 - d) výpočet (spracovanie nameraných hodnôt – uviesť vždy jeden vzorový výpočet),
 - e) záver (stručné zhodnotenie dosiahnutých výsledkov – uviesť príčinu, ak dosiahnutý výsledok nezodpovedá skutočnosti).
7. Pred odchodom je každý študent povinný odovzdať pracovný stôl príslušnému technikovi, ktorý skontroluje jeho obsah a čistotu.

Všeobecné pravidlá

Pri práci v chemickom laboratóriu sa musia bezpodmienečne dodržiavať pravidlá o hygiene a bezpečnosti práce.

Základom bezpečnej experimentálnej práce je:

- poriadok a disciplína;
- dôkladná teoretická príprava;
- sústredenosť pri práci;
- osvojenie si a dodržiavanie správnych pracovných techník.

Znalosť zásad bezpečnej práce:

1. Do chemického laboratória vstupujeme v pracovnom plášti a nosíme so sebou len potrebné pomôcky (pracovné zošity, kalkulačky, písacie potreby). Podľa povahy práce (manipulácia s koncentrovanými kyselinami a lúhmi, práce s výbušnými látkami, práce za zníženého alebo zvýšeného tlaku) používame osobné ochranné prostriedky (ochranný štít, rukavice, vhodnú pracovnú obuv, ochranné okuliare a i.).
2. V chemickom laboratóriu sa nesmie jesť, prechovávať potraviny, piť z laboratórnych nádob, fajčiť. Nádoby na pitie musia byť pre tieto účely zvlášť označené! Po skončení práce, si pred odchodom z laboratória umyjeme ruky mydlom.
3. Pre prácu používame len bezpečne známe, riadne označené chemikálie, nepoškodené chemické nádoby a pomôcky, ktoré po skončení práce očistíme a ukladáme na určené miesta.
4. Pri práci so sklom sa chránime pred porezaním:
 - sklenené rúrky, tyčinky, teplomery a pod. zasúvame do otvoru zátky alebo hadice bez násilia, vždy vopred zvlhčené glycerolom alebo vodou. Trubicu držíme pri zátku (nie v ohybe!) a zasúvame krúživým pohybom. Ruky si chránime tkaninou!
 - tesnosť a zároveň pohyblivosť zbrúsených sklenených plôch (kohúty, zábrusové časti aparátúr) zabezpečujeme vhodným mazadlom (napr. Ramsayov tuk), ktoré sa nanáša vždy len v malom množstve na časť zbrúsenej plochy a pozorným otáčaním sa rozotrie po celom zábruse vo veľmi tenkej vrstve.
 - zátky reagenčných fliaš nekladíme zbrúsenou časťou na stôl. Pri nalievaní kvapaliny držíme reagenčnú fľašu tak, aby sme štítok s označením mali na dlani. Stekajúcu kvapalinu číidla otrieme o zátku reagenčnej fľaše.
 - zvyšky rozbitého skla odstraňujeme zo stola kefkou (nie rukou) do odpadového koša s pevným dnom.
5. Pre prácu s chemikáliami sú nevyhnutné odborné vedomosti o ich vlastnostiach
 - chemikálie nikdy nechutnávame, zápach zisťujeme usmerným pohybom ruky. Prechovávajú sa zásadne v uzavretých nádobách.
 - pri riedení kyselín lejeme vždy opatrne kyselinu tenkým prúdom za stáleho miešania a chladenia **do vody** (nie naopak!).
 - pri rozpúšťaní tuhých hydroxidov sypeme tieto postupne do vody za stáleho miešania a chladenia.
 - všetky manipulácie s prchavými, zápachajúcimi, výbušnými, horľavými látkami a jedovatými plynmi robíme za dobrého vetrania v digestóriu s dostatočným odťahom. S horľavými látkami sa nesmie pracovať v blízkosti otvoreného plameňa! Pri rozliatí horľaviny treba okamžite zhasnúť kahany, vypnúť elektrický prúd a postarať sa o dokonalé vetranie miestnosti.
 - žieraviny, jedovaté a prchavé látky odmeriavame odmerným valcom, alebo bezpečnostnou pipetou s balónikom.
6. Pri zahrievaní, varení vody, alebo iných kvapalín pridávame do varných nádob pórovité

telieska, tzv. varné kamienky (kúsky porcelánových čriepkov, úlomky nepolievaného porcelánu, sklené guľičky, frity a pod.), aby sa zabránilo utajenému varu, ktorý môže vzniknúť miestnym prehriatím kvapaliny o niekoľko stupňov nad jej teplotu varu. Náhodný popud potom vyvoláva prudký, niekedy až explozívny var. Nad zahrievanú kvapalinu sa nikdy nenakláňame! Keď nemožno použiť varné telieska, miešame kvapalinu sklenenou tyčinkou. Pri zahrievaní v skúmavke upevňujeme skúmavku do držiaka, pridržiavame ju šikmo, otvorom od seba a od spolupracujúcich. Skúmavkou pohybujeme tak, aby sa kvapalina rovnomerne zahrievala.

7. Pre prípad požiaru má byť nablízku ľahko dostupné dostatočné množstvo vody, piesok, starý plášť (plátno, prikrývka), hasiaci prístroj.
8. Rešpektujte vždy pokyny vedúceho cvičenia pri konkrétnych úlohách, pri likvidácii odpadu, bezdôvodne neopúšťajte pracovné miesto a nenechávajte aparatúry, v ktorých prebiehajú chemické reakcie bez dozoru. Vyhnite sa zbytočnému riziku nebezpečenstva, ktoré so sebou prináša povaha práce v chemickom laboratóriu.
9. Príslušné pokyny pre prácu v chemickom laboratóriu a výstražná obrazová symbolika sú v laboratóriu umiestnené na viditeľnom mieste. **OBOZNÁMTE SA S NIMI!**

Základné zásady poskytovania prvej pomoci

Pri nehodách poskytujeme v laboratóriu len prvú pomoc. Každý úraz je však potrebné brať vážnejšie ako sa javí, pretože neuvážený zásah môže postihnutému viac poškodiť ako prospieť. Preto, okrem okamžitého ošetrovania, zabezpečujeme postihnutému odborné lekárske ošetrovanie.

O každom, i úplne nepatrnom úraze informujte vedúceho cvičenia!

Pri experimentálnej práci sa môžu najčastejšie vyskytnúť:

- mechanické úrazy (rezné, tržné a bodné rany);
- poleptania (kyselinami a lúhmi);
- popáleniny (horúcim predmetom);
- otravy požitím jedovaných látok;
- úrazy spôsobené explóziou;
- úrazy elektrickým prúdom.

Mechanické úrazy sú spôsobené obyčajne neopatrnosťou pri zaobchádzaní so sklom, alebo nesprávnym odhadom jeho mechanickej pevnosti. Menšie poranenia a odreniny (ak nezostalo v ranách sklo!) ošetríme priamo v laboratóriu. Okolie rán umyjeme alkoholom, alebo 1,5 – 3 %-ným roztokom peroxidu vodíka. Pri väčších poraneniach predbežne obviažeme suchým sterilným obvazom (neprikladať vatú!) a vyhladáme odborné ošetrovanie.

Poleptania pokožky alebo sliznice dýchacieho ústrojenstva spôsobujú žieraviny. Poleptané miesta opláchneme čo najskôr silným prúdom vody, potom postihnuté miesto omývame gázou namočenou do:

3 %-ného roztoku NaHCO_3 pri poleptaní kyselinami

3 – 10 %-ného roztoku kyseliny citrónovej alebo octovej pri poleptaní lúhmi.

Pri poleptaní oka okamžite vyplachujeme tečúcou vodou 15 až 20 minút (tlak vody nesmie byť príliš silný, aby nepoškodil zrak). Každé, aj najmenšie zasiahnutie oka musí byť vyšetrené lekárom!

Ak pri poleptaní dýchacieho ústrojenstva žieravými plynmi (NH_3 , H_2S , HCl , SO_2) trvá dráždivý kašeľ po opustení zamoreného priestoru dlhšie ako 10 minút, musíme postihnutého okamžite dopraviť k lekárovi.

Pri popáleninách malé zranenia ochladíme tečúcou vodou, alebo na postihnuté miesto

priložíme ľad a prikryjeme suchým sterilným obvazom. Pri rozsiahlejšom zasiahnutí popálené (alebo ohorené) miesto len prikryjeme suchým sterilným obvazovým materiálom pre ochranu pred infekciou a zraneného dopravíme čo najskôr do nemocnice.

Pri otravách jedovatými látkami alebo plynmi je potrebné ihneď vyhľadať alebo privolať lekársku pomoc a informovať lekára, ktorá látka otravu spôsobila.

Pri otravách kyselinami alebo lúhmi je vhodné bezprostredne po požití vyvolať zvracanie. Neskôr (po 10 – 15 min) by to mohlo vyvolať zhoršenie stavu. Ako neutralizačné prostriedky podávame:

- pri kyselinách *suspenziu MgO v ľadovej vode, (pitie vody resp. mlieka pôsobí priaznivo, i keď neutralizačný účinok nemá),*
- pri hydroxidoch *dávame postihnutému vypiť zriedenú (1 %) kyselinu octovú, alebo zriedenú citrónovú šťavu.*

Pri otravách vdýchnutím jedovatých látok zabezpečíme prenos postihnutého na čerstvý vzduch a urýchlený prevoz do nemocnice.

Pri každom úraze musíme počítat' s tým, že úrazy a zľaknutia sú sprevádzané šokom. Neliečený šok môže mať veľmi vážne následky, preto každému úrazu venujeme starostlivosť i vtedy, keď sa účinok zjavne v čase úrazu neprejavuje.

Prehľad škodlivých chemikálií a prvá pomoc pri práci s nimi:

Látka	Prvá pomoc
Acetón	čerstvý vzduch, inhalácia kyslíka
Acetylén	čerstvý vzduch, umelé dýchanie
Acetylchlorid	čerstvý vzduch, oči vypláchnuť zriedeným hydrogénuhličitanom sodným
Akroleín a deriváty	čerstvý vzduch, inhalácia kyslíka
Akridín a deriváty	čerstvý vzduch, inhalácia kyslíka
Aldehydy	čerstvý vzduch, spláchnuť zriedeným amoniakom, piť roztok amónnych solí, surové vajce, výplach žalúdka
Alkalické kovy	spláchnuť silným alkoholom
Alkaloidy	zvracanie, lekár
Alkoholy	výplach žalúdka, čierna káva, inhalácia kyslíka, lekár
Alkylestery	inhalácia kyslíka
Alkylhalogenidy	čerstvý vzduch, pokoj, vymeniť šatstvo, umelé dýchanie, inhalácia kyslíka a oxidu uhličitého
Amíny (anilín a iné)	čerstvý vzduch, telo umyť teplou vodou a mydlom, výplach žalúdka, živočíšne uhlie, preháňadlo, silná káva, inhalácia kyslíka, vitamín C, lekár, žiaden alkohol alebo tuk, nevystavovať sa slnku
Amoniak	čerstvý vzduch, vdychovať pary kyseliny octovej, zaviesť umelé dýchanie, oči vymyť roztokom hydrogénuhličitanu sodného
Antimón a zlúčeniny	výplach žalúdka oxidom horečnatým a živočíšnym uhlím
Arzén a zlúčeniny	výplach žalúdka oxidom horečnatým a živočíšnym uhlím, lekár
Arzénovodík	čerstvý vzduch, roztok uhličitanu sodného, lekár
Atropín	výplach žalúdka, živočíšne uhlie, lekár
Barbituráty	zvracanie, výplach žalúdka, čierna káva, dostatok tekutín, lekár
Bárium a zlúčeniny	výplach žalúdka síranom sodným alebo horečnatým, lekár
Benzén	telo umyť vodou a mydlom, inhalácia kyslíka, výplach žalúdka roztokom oxidu horečnatého, živočíšne uhlie
Benzylchlorid(bromid)	čerstvý vzduch
Dialkylsulfáty	čerstvý vzduch, teplo, oči a poleptané miesta vyplachovať hydrogénuhličita-

	nom sodným
Dusičnany, dusitany	výplach žalúdka, živočíšne uhlie, kofeín, kyslík, lekár
Dusičnan draselný	výplach žalúdka mliekom, vaječný bielok, voda
Éter	čerstvý vzduch, výplach žalúdka
Etylénoxid	čerstvý vzduch, inhalácia kyslíka, v prípade potreby umelé dýchanie, oči vypláchnuť hydrogénuhličitanom sodným
Fenol	mlieko, výplach žalúdka oxidom horečnatým, živočíšne uhlie, pokožku umyť alkoholom
Fenylhydrazín	čerstvý vzduch, výmena odevu, silná káva, nedávať alkohol ani tuk, pokožku zmyť alkoholom
Fosfor	umyť 5 % síranom meďnatým, piť 1 % peroxid vodíka, umelé dýchanie, inhalácia kyslíka, nedávať mlieko ani tuk
Glykol a homológy	piť alkalické vody
Hexachlórkyklohexán	umyť telo vodou a mydlom, výplach žalúdka, živočíšne uhlie, prehľadadlo alebo 100 až 200 ml parafínového oleja, nedávať iný olej, mlieko alebo alkohol, lekár
Chlór	inhalácia aerosólu hydrogénuhličitanu sodného, kyslík, lekár
Chlorid uhličitý	čerstvý vzduch, umelé dýchanie, silná káva, nedávať mlieko, tuk, ani alkoholické nápoje, oči vypláchnuť vodou, lekár
Chlorid zinočnatý	silná káva, piť roztok tiosíranu sodného
Chlorečnany	roztok hydrogénuhličitanu sodného, prehľadadlá, nedávať alkohol, lekár
Chloroform	umelé dýchanie, inhalácia kyslíka
Chlórové vápno	pokožku opláchnuť, neutralizovať, krémovať
Chróm a zlúčeniny	poranené miesta umyť síranom sodným, piť mlieko, bielkoviny, oxid horečnatý, živočíšne uhlie
Kadmium a zlúčeniny	inhalácia aerosólu hydrogénuhličitanu sodného, kyslík, lekár
Kyán a zlúčeniny	výplach žalúdka, živočíšne uhlie, inhalácia kyslíka, umelé dýchanie, 3 % peroxid vodíka, lekár
Kyseliny	výplach úst studenou vodou, roztok hydrogénuhličitanu sodného, výplach žalúdka, mlieko, vaječný bielok, lekár
Luhy	výplach úst studenou vodou, zriedený ocot, výplach žalúdka, mlieko
Mangán a zlúčeniny	výplach žalúdka, živočíšne uhlie, lekár
Meď a zlúčeniny	výplach žalúdka, mlieko, bielok, oxid horečnatý
Nitrobenzén	kyslík, lekár, nedávať alkohol, nenechať na slnku
Nitrózne plyny	kyslík, pokoj, teplo, vdychovanie zriedeného amoniaku, veľa tekutín
Olovo a zlúčeniny	dávenie, síran sodný, citran sodný, mlieko, bielok, lekár
Ortuť a zlúčeniny	mlieko, bielok, 5 % tiosíran sodný, zvracanie
Oxid siričitý	inhalácia aerosólu hydrogénuhličitanu sodného
Oxid uhličitý	čerstvý vzduch, kyslík
Oxid uhoľnatý	čerstvý vzduch, kyslík s 5 až 7 % oxidu uhličitého
Pyridín	výplach žalúdka, živočíšne uhlie, ricínový olej, inhalácia kyslíka s oxidom uhličitým
Salicyláty	výplach žalúdka 5 % hydrogénuhličitanom sodným, živočíšne uhlie, lekár
Sírouhlík	čerstvý vzduch, kyslík, lekár
Sulfán	čerstvý vzduch, umelé dýchanie, kyslík, výplach očí vodou, lekár
Trichlóretylén	umelé dýchanie, výplach žalúdka, živočíšne uhlie, nepodávať tuky
Uhľovodíky	čerstvý vzduch, kyslík s oxidom uhličitým, nepodávať alkohol
Zinok a zlúčeniny	výplach žalúdka, živočíšne uhlie, hydrogénuhličitan sodný

Materiály v chemickom laboratóriu

Na výrobu pomôcok, ktoré sa pri bežnej práci v laboratóriu používajú, sa najčastejšie využíva chemické sklo, porcelán, kovy, drevo, rôzne plasty, papier a pod.

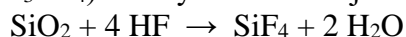
Chemické sklo a jeho vlastnosti

Vo všeobecnosti sklom nazývame amorfné (nekryštalické) stuhnuté taveniny. Sklo, z ktorého sa vyrábajú laboratórne pomôcky, musí byť odolné proti náhlym zmenám teploty a chemickým vplyvom. Chemické sklo je tuhý roztok kremičitanov, ktorý obsahuje v nadbytku SiO_2 . Čím je obsah SiO_2 vyšší, tým je kvalita skla vyššia. Okrem SiO_2 obsahuje sklo oxid boritý, oxid hlinitý, oxidy alkalických kovov a kovov alkalických zemín, oxid fosforečný a oxidy rôznych kovov podľa funkčného využitia skla. Chemickým zložením a kombináciou pomeru zložiek sa získava sklo rôznej kvality, najmä z hľadiska tepelnej odolnosti a odolnosti voči chemickým vplyvom. Tepelnú odolnosť skla vyjadruje koeficient tepelnej rozťažnosti α , ktorý číselne vyjadruje dĺžkové rozťahnutie skla pri zmene o 1°C . Čím je koeficient rozťažnosti skla α nižší, tým má sklo väčšiu odolnosť voči náhlym zmenám teploty (napr. pri chemickom skle je $\alpha = 32 - 50 \cdot 10^{-7}$, kým pri obyčajnom tabuľovom skle $\alpha = 100 - 130 \cdot 10^{-7}$). Odolnosť chemického skla sa zvyšuje so znižovaním hrúbky stien, hrubostenné nádoby používame len tam, kde nedochádza k veľkým alebo náhlym zmenám teploty.

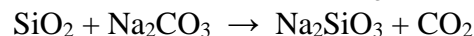
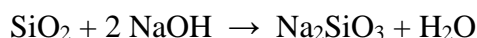
Pre laboratórne pomôcky sa používa:

- mäkké sklo** (sodno-vápenaté), ktoré má premenlivé zloženie a neznaša prudké zmeny teploty (valce, hodinové sklá, lieviky, exikátory a pod.)
- tvrdé sklo** (borosilikátové), ktoré má malú tepelnú rozťažnosť, dobre znaša zmeny teploty (skúmavky, banky, kadičky a pod.)
- kremenné sklo**, ktoré vzniká rýchlym ochladením roztaveného SiO_2 ako sklovitá amorfná látka, má vysokú teplotnú odolnosť (znaša kratšie zohriatie až na 140°C), malý koeficient rozťažnosti ($5,5 \cdot 10^{-7}$). Nádoby z kremenného skla sa môžu rozpáliť do červena a ponoriť do studenej vody bez prasknutia. Z kremenného skla sa vyrábajú napr. spaľovacie trubice, alebo nádoby používané pri fotochemických reakciách.

Chemické sklo sa vyznačuje odolnosťou voči chemickým vplyvom, najmä voči kyselinám. Len HF (pri vyšších teplotách aj H_3PO_4) sklo rýchlo rozrušuje:

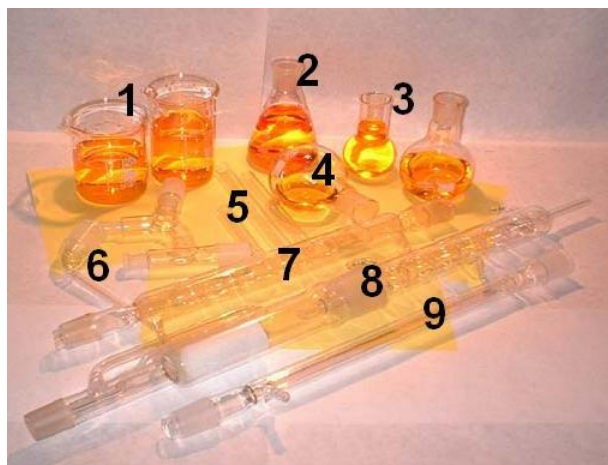


Koncentrované hydroxidy porušujú sklo pri zvýšenej teplote a pri alkalickom tavení sa môže sklo celkom rozložiť:

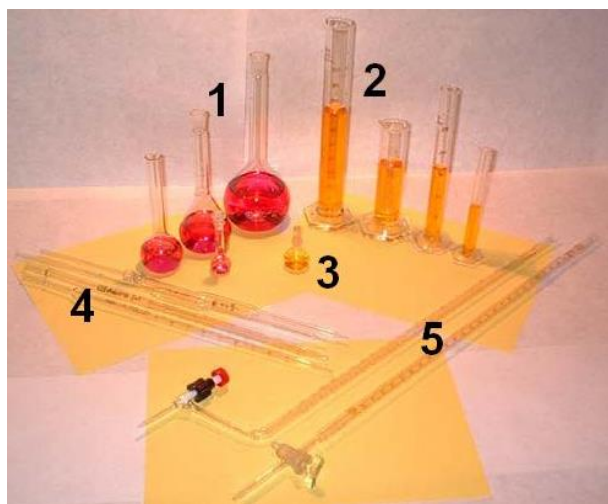


Podľa určenia a charakteru práce sa pomôcky zo skla delia do troch skupín:

- chemické varné sklo (obrázok 1)
- chemické odmerné sklo (obrázok 2)
- chemické technické sklo (obrázok 3)

**Obrázok 1 Chemické varné sklo**

1 – kadička, 2 – Erlenmayerova banka, 3 – titračná banka, 4 – varná banka s guľatým dnom, 5 – reagenčná skúmavka, 6 – destilačný nástavec, alonž, 7 – guľčkový chladič, 8 – Soxhletov prístroj, 9 – Liebigov chladič

**Obrázok 2 Chemické odmerné sklo**

1 – odmerné banky, 2 – odmerné valce, 3 – pyknometer, 4 – pipety, 5 – byreta s rovným a bočným kohútikom

**Obrázok 3 Chemické technické sklo**

1 – prachovnica, 2 – reagenčná fľaša, 3 – odsávací banka, 4 – premývačka, 5 – exikátor, 6 – trecia miska, 7 – Büchnerov lievnik, 8 – filtračné lievniky, 9 – kvapadlá, 10 – navažovačka s vrchnáčkou, 11 – navažovacia lodička, 13 – hodinové sklíčka, 14 – Petriho miska, 15 – oddeľovací lievnik

Sklenené zábrusy

Pri zostavovaní a spájaní jednotlivých sklenených častí aparátúr sa používajú sklenené zábrusy. Zábrus tvoria dve zabrúsené, tesne k sebe priliehajúce plochy, tzv. **jadro**, s vonkajšou brúsenou plochou a tzv. **plášť** s vnútorným brúsením. Môžu byť rovinné, kužeľovité, valcovité, guľovité. Pre laboratórne účely sa najčastejšie používajú kužeľovité zábrusy. Aby sa jednotlivé časti aparátúr mohli vzájomne vymieňať, musia mať zábrusy obidvoch dielov určité a presné rozmery, tzv. normalizované zábrusy (NZ). Zábrus označený napr. NZ 29/32 je kužeľovitý zábrus s horným (väčším) priemerom 29 mm a výškou 32 mm.

Nenormalizované zábrusy majú ľubovoľné rozmery a vyskytujú sa napr. na zátkach reagenčných fliaš, na prietokových kohútoch, na odmerných bankách a pod. Zábrusy pred použitím natierame vhodným mazadlom (napr. Ramsayov tuk), ktoré v malom množstve nanesieme na zábrus a obidve časti zľahka pritlačíme. Pootočením sa mazadlo rovnomerne rozotrie.

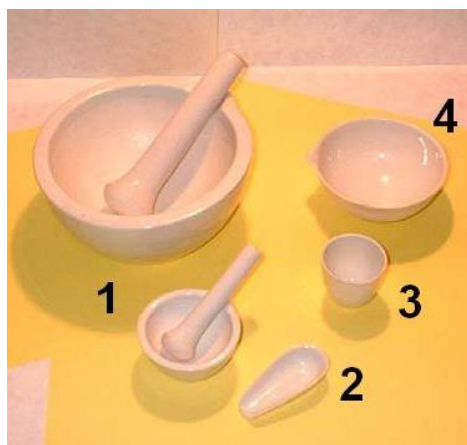
Čistenie skla

Pri experimentálnej práci musíme používať všetky nádoby zo skla vždy čisté, preto ich zásadne čistíme hneď po použití. Postup čistenia môže byť mechanický, alebo chemický.

Pri mechanickom spôsobe dávame pozor, aby sa nepoškodil hladký povrch skla. Pri chemickom čistení používame rozpúšťadlá (benzín, benzol, alkohol a pod.), alebo oxidačné zmesi, vždy podľa charakteru znečistenia. Po odstránení nečistôt je potrebné nádoby niekoľkokrát opláchnuť vodou, nakoniec malým množstvom destilovanej vody a necháme uschnúť voľne, alebo v sušiarňi (odmerné nádoby nesmieme vkladať do sušiarne).

Porcelán

Porcelán používaný v chemickom laboratóriu má vysokú mechanickú a chemickú odolnosť (je však citlivý na nárazy a ľahko sa triešti), je vhodný na výrobu nádob na žihanie, odparovanie a váženie (obrázok 4), pretože povrchové viazanie vody je prakticky nulové.



Obrázok 4 Laboratórne pomôcky z porcelánu

1 – roztieračky s roztieradlom, 2 – navažovacia lodička, 3 – porcelánový téglík, 4 – odparovacia miska

Kovové materiály

Kovy a zliatiny kovov sa používajú v chemickom laboratóriu ako všeobecný konštrukčný materiál. V porovnaní so sklom majú kovy vysokú mechanickú pevnosť, nie sú krehké, majú podstatne vyššiu tepelnú a elektrickú vodivosť a tepelnú rozťažnosť. Kovové nádoby a aparatury sa používajú všade tam, kde nemôžeme použiť sklo, porcelán, prípadne kremenné sklo. Z kovov a ich zliatin sa vyrábajú podstavce a tyče na stojany, svorky, lapáky, kruhy, trojnožky, téglíky, pinzety, tlačky, kahany a pod. (obrázok 5). Pre špeciálne účely sa používajú nádoby a pomôcky z rôznych kovov (napr. zo zlata, platiny, striebra, niklu, medi, chrómu a pod.).



Obrázok 5 Kovové laboratórne pomôcky

1 – stojan, 2 – téglíkové kliešte, 3 – pinzeta, 4 – železný kruh, 5 – filtračný kruh s drevenou vložkou, 6 – špachtle, 7 – držiak na skúmavku, 8, 9, 10 – držiaky, 11 – krížová svorka, 12 – azbestová sieťka

Nekovové materiály

Z ostatných materiálov sa v chemickom laboratóriu používa najmä:

korok – (zátky, podložky, tesnenia, tepelne izolačný materiál)

guma – (spojovací a tesniaci materiál, hadice, vzdušné balóniky). Účinkom silnejších kyselín a vplyvom slnečného žiarenia guma tvrdne, vo väčšine organických rozpúšťadiel napučíava, stráca pevnosť, alebo sa celkom rozpustí.

plastické hmoty – pre svoje výhodné vlastnosti našli v laboratórnej praxi široké uplatnenie.





drevo – tvrdé drevo sa používa na zhotovenie niektorých častí laboratórneho zariadenia (napr. drevená vložka filtračného kruhu, drevené stojany na skúmavky, držadlo na skúmavky, a pod.). Povrch je obyčajne impregnovaný, alebo natretý ochranným náterom.

papier – používa sa v chemickom laboratóriu ako filtračný materiál.

Chemikálie

Väčšina chemikálií, s ktorými v laboratóriu pracujeme, je viac či menej nebezpečná. K preventívnej ochrane zdravia a bezpečnosti pri práci preto nevyhnutne patrí bezpečné zaobchádzanie a uskladňovanie chemikálií. Pre prácu s chemikáliami platia určité normy a nariadenia, s ktorými sa musí každý chemik oboznámiť pred začatím práce.

Na základe Nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 boli vypracované kritériá pre klasifikáciu, označovanie a balenie chemických látok, v skratke CLP (*Classification, Labelling and Packaging of substances*). CLP vychádza z globálneho harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemických látok (GHS, *Globally Harmonized System*) pripraveného Organizáciou spojených národov (OSN). Cieľom je identifikácia nebezpečných chemikálií a informovanie používateľov o týchto nebezpečenstvách prostredníctvom symbolov (tabuľka 1) a viet na štítkoch obalov a prostredníctvom kariet bezpečnostných údajov. GHS zabezpečuje vysokú úroveň ochrany ľudského zdravia a životného prostredia.

TABUĽKA 1 Výstražné piktogramy na označovanie chemikálií podľa OSN (GHS/CLP)	
Piktogram	Výstražné upozornenie
 GHS01	<ul style="list-style-type: none"> – nestabilná výbušnina – výbušnina; nebezpečenstvo rozsiahleho výbuchu – výbušnina; závažné nebezpečenstvo rozletenia úlomkov – výbušnina; nebezpečenstvo požiaru, výbuchu alebo rozletenia úlomkov – nebezpečenstvo požiaru alebo rozletenia úlomkov – zahrievanie môže spôsobiť výbuch
 GHS02	<ul style="list-style-type: none"> – mimoriadne horľavý plyn – mimoriadne horľavý aerosól – horľavý aerosól – mimoriadne horľavá kvapalina a pary – veľmi horľavá kvapalina a pary – horľavá kvapalina a pary – horľavá tuhá látka – zahrievanie môže spôsobiť požiar – pri kontakte so vzduchom sa spontánne vznietí – samovoľne sa zahrieva; môže sa vznietiť – vo veľkých množstvách sa samovoľne zahrieva; môže sa vznietiť – pri kontakte s vodou uvoľňuje horľavé plyny, ktoré sa môžu spontánne zapáliť – pri kontakte s vodou uvoľňuje horľavé plyny
 GHS03	<ul style="list-style-type: none"> – môže spôsobiť alebo prispieť k rozvoju požiaru; oxidačné činidlo – môže spôsobiť požiar alebo výbuch; silné oxidačné činidlo – môže prispieť k rozvoju požiaru; oxidačné činidlo
 GHS04	<ul style="list-style-type: none"> – obsahuje plyn pod tlakom; pri zahriatí môže vybuchnúť – obsahuje schladený plyn; môže spôsobiť kryogénne popáleniny alebo poranenia

TABUĽKA 1 (pokračovanie)	
 <p>GHS05</p>	<ul style="list-style-type: none"> – môže byť korozívna pre kovy – spôsobuje vážne poleptanie kože a poškodenie očí – spôsobuje vážne poškodenie očí
 <p>GHS06</p>	<ul style="list-style-type: none"> – smrteľný po požití, pri kontakte s pokožkou, pri vdýchnutí – toxický po požití, pri kontakte s pokožkou, pri vdýchnutí
 <p>GHS07</p>	<ul style="list-style-type: none"> – škodlivý po požití, pri kontakte s pokožkou, pri vdýchnutí – dráždi kožu – spôsobuje vážne podráždenie očí – môže vyvolať alergickú kožnú reakciu – môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest alebo môže spôsobiť ospalosť a závraty
 <p>GHS08</p>	<ul style="list-style-type: none"> – pri vdýchnutí môže vyvolať alergiu alebo príznaky astmy, alebo dýchacie ťažkosti – môže spôsobovať genetické poškodenie – podozrivý, že spôsobuje genetické poškodenie – môže spôsobiť rakovinu – podozrenie, že spôsobuje rakovinu – môže spôsobiť poškodenie plodnosti alebo nenarodeného dieťaťa – podozrenie, že spôsobuje poškodenie plodnosti alebo nenarodeného dieťaťa – spôsobuje poškodenie orgánov – môže spôsobiť poškodenie orgánov – môže byť smrteľný po požití a vniknutí do dýchacích ciest
 <p>GHS09</p>	<ul style="list-style-type: none"> – veľmi toxický pre vodné organizmy – veľmi toxický pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami – toxický pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami
zdroj: Úradný vestník Európskej únie, L 353, zväzok 51, 31.12.2008, slovenské vydanie	

Čistota chemikálií

Chemikálie sa vyskytujú v niekoľkých stupňoch čistoty. Označujú sa ako chemikálie *technické, čisté a chemicky čisté*. Chemikálie zvlášť čisté sú takmer chemické individuá, určené pre osobitné vedecké účely (napr. pre spektrálne účely).

Niektoré chemikálie sú **kryštalické** látky s rôznym počtom molekúl vody ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$), alebo sú **bezvodé**. Tieto údaje sú dôležité pri príprave presných koncentrácií, aby sme pri analýzach nedospeli k chybným výsledkom.

TABUĽKA 2 Rozdelenie chemikálií z hľadiska čistoty v zmysle platnej normy				
Skupina a podskupina	Označenie	Skratka	Latinské označenie	Skratka
I. 1	zvlášť čistý	zv.č.	purum speciale	pur.sp.
II. 2	chemicky čistý pre analýzu čistý	ch.č.	purissimum	puriss.
3		p.a.	pro analysi	p.a.
4		č.	purum	pur.
III. 5	čistený	čistený	depuratum	depur.
6	technický	techn.	technicum	techn.
7	surový	sur.	crudum	crud.

Čisté lekárenské chemikálie sa dodávajú v akosti, ktoré vyhovujú požiadavkám liekopisov a obsah primiešanín sa neposudzuje len podľa množstva, ale aj podľa škodlivosti ľudskému zdraviu. V takých prípadoch sa pri názve chemikálie uvádza skratka príslušného liekopisu.

Toxicita chemikálií

V minulosti boli podľa škodlivosti pre zdravie človeka chemikálie rozdeľované na:

- zvlášť nebezpečné jedy (ZN jedy),
- ostatné jedy,
- omamné látky,
- žieraviny.

Jedy sú látky, spôsobujúce otravy už v malých dávkach. Zaobchádzať s nimi môžu len pracovníci, ktorí dovŕšili 18 rokov a majú na to zdravotnú a odbornú spôsobilosť.

Všetky jedy musia byť bezpečne uzamknuté, presne evidované a prísne kontrolované, aby k nim nemali prístup nepovolané osoby.

Omamné látky a psychotropné látky sú také, pri ktorých vzniká nebezpečenstvo chorobného návyku, alebo psychických zmien. Ich nákup a spotreba podliehajú evidencii (zodpovednou osobou je lekár, zverolekár alebo farmaceut) a štvrtročnému hláseniu RÚVZ.

Žieraviny sú látky, ktoré ťažko poškodzujú tkanivá, ak s nimi prídu do priameho styku. K najsilnejším žieravinám patrí bróm, H_2O_2 , $AgNO_3$, všetky silné kyseliny a silné hydroxidy, fenol, formaldehyd a pod. Jedy a chemické karcinogény, alebo látky podozrivé z chemickej karcinogenity sa nesmú dostať do životného prostredia ako odpad (chemické karcinogény sa nesmú používať, ak ich možno nahradiť menej nebezpečnými látkami).

Horľaviny

Horľaviny sú látky ľahko zápalné. Môžu byť skupenstva:

- *tuhého* (biely fosfor, sodík, draslík, práškové kovy)
- *kvapalného* (éter, sírouhlík, acetón, metanol)
- *plynného* (svietiplyn, vodík, acetylén, pary niektorých horľavín v zmesi so vzduchom sú výbušné!)

Horľavé **kvapaliny** sa podľa bodu vzplanutia triedia do štyroch tried:

I. trieda	do 21 °C
II. trieda	21 – 55 °C
III. trieda	55 – 100 °C
IV. trieda	100 – 250 °C

V blízkosti horľavín nesmú byť uskladnené látky s oxidačnými účinkami (HNO_3 , peroxidy, dusičnany, chlorečnany a pod.).

Chemikálie (pri ich uskladňovaní a prechovávaní) chránime pred priamym slnečným

osvetlením a pred iným ohrevom.

Látky, ktoré sa svetlom rozkladajú, prechováame v nádobách z neprehľadného materiálu, alebo v nádobách z tmavého skla.

Alkalické kovy (sodík, draslík) musia byť uložené pod ochrannou vrstvou inertného vysokovriaceho rozpúšťadla (petrolej, parafínový olej). Samozápalný biely fosfor uschováame pod ochrannou vrstvou vody.

Éter sa nesmie uchovávať v poloprázdnych a svetlých fľašiach, pretože za prístupu vzduchu a svetla vzniká dietylperoxid, ktorý je veľmi explozívny. K výbuchu môže dôjsť už pri samotnom prelievaní éteru s použitím lievika, keď vírivý pohyb v stopke lievika strhuje kyslík zo vzduchu a éter sa zapáli.

Výbušniny

Najväčšie nebezpečenstvo hrozí pri vyslovene explozívnych látkach, tzv. výbušninách. V bežných laboratóriách je zakázané pracovať s výbušninami. Pre prácu s výbušninami sú špeciálne zariadené pracoviská.

Za určitých okolností však môžu explodovať aj iné látky, napr. KClO_3 znečistený organickou látkou pri prudkom zahriatí vybuchuje.

V chemickom laboratóriu dochádza k explózií najčastejšie pri vzniku zmesi plynov alebo pár so vzduchom (výbušná, tzv. traskavá zmes). Ak vo vnútri aparatury vznikne traskavá zmes, alebo ak je reakcia spojená s uvoľňovaním plynov a tlak v aparature prudko stúpne, môže ľahko nastať explózia (aparatura musí byť odvzdušnená!).

Pri práci za zníženého tlaku môže vo vákuových aparaturách nastať pri prudkom vyrovnávaní tlakov **implózia**, ktorej účinky bývajú často horšie ako explózie.

1 BIELKOVINY

Bielkoviny (proteíny, z gréckeho *prota* = prvotný význam) sú nevyhnutnou súčasťou prakticky všetkých biologických procesov. Význam a obrovský rozsah ich aktivity je ukázaný na niektorých nasledujúcich príkladoch:

1. Enzymová katalýza. Takmer všetky chemické reakcie v biologických systémoch sú katalyzované špecifickými makromolekulami – enzýmami. Niektoré z nich, ako hydratácia oxidu uhličitého, sú relatívne jednoduché. Iné, ako replikácia celého chromozómu, sú naopak extrémne komplikované. Chemické transformácie *in vivo* prebiehajú bez prítomnosti enzýmov zanedbateľnou rýchlosťou. Enzýmy sú enormne efektívne katalyzátory. Zvyčajne zvyšujú rýchlosť reakcií viac ako 10^6 -krát. Bolo charakterizovaných niekoľko tisíc enzýmov a mnohé z nich boli aj kryštalizované. Je pozoruhodné, že takmer všetky známe enzýmy sú proteíny. Proteíny sú preto centrálnym objektom pri štúdiu chemických transformácií v biologických systémoch.

2. Transport a skladovanie. Množstvo malých molekúl a iónov je transportovaných špecifickými proteínmi. Napríklad, hemoglobín prenáša kyslík v erythrocytoch, zatiaľ čo myoglobín, príbuzný proteín, prenáša kyslík vo svaloch. Železo je prenášané v krvnej plazme pomocou transferínu a je skladované v pečeni v komplexe s feritínom, nepríbuzným proteínom.

3. Koordinovaný pohyb. Proteíny sú hlavným komponentom vo svaloch. Svalová kontrakcia je uskutočňovaná kĺzavým pohybom 2 druhov proteínových filamentov. Podobne, koordinované pohyby – ako pohyb chromozómov počas mitózy a pohon spermíí pomocou flagel, sú tiež uskutočňované kontraktílnym súborom pozostávajúcim z proteínov.

4. Mechanická podpora. Vysoká ťahová sila kože a kostí je dôsledkom prítomnosti kolagénu, fibrilárneho proteínu.

5. Imunitná ochrana. Protilátky sú vysoko špecifické proteíny, ktoré spoznávajú a interagujú s cudzími substanciami ako sú vírusy, baktérie a bunky z iných organizmov. Proteíny takto hrajú podstatnú úlohu v rozlišovaní medzi vlastným a cudzím.

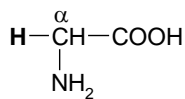
6. Tvorba a prenos nervových impulzov. Odpoveď nervových buniek na špecifické stimuly je sprostredkovaná receptorovými proteínmi. Receptorové proteíny, ktoré môžu byť aktivované špecifickými malými molekulami, ako napr. acetylcholín, sú zodpovedné za prenos nervových impulzov na synapsiách – spojeniach medzi nervovými bunkami.

7. Kontrola rastu a diferenciácia. Kontrolovaná sekvenčná expresia genetickej informácie je základom riadeného rastu a diferenciácie buniek. Iba malá frakcia genómu v bunke je exprimovaná v danom určitom čase. V baktériách sú represorové proteíny dôležitým kontrolným elementom, ktorý utlmuje špecifické segmenty v DNA bunky. Vo vyšších organizmoch sú rast a diferenciácia kontrolované proteínovými rastovými faktormi. Napr. nervový rastový faktor riadi tvorbu neurónových sietí. Aktivita v rozličných bunkách mnohobunkových organizmov je koordinovaná hormónmi, ako napr. tyreotropín (glykoproteín), inzulín (peptidový hormón). Proteíny slúžia vo všetkých bunkách ako senzory, ktoré kontrolujú tok energie a látok.

Proteíny sú tvorené z 20 aminokyselín

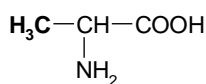
Aminokyseliny sú základnými štruktúrnymi jednotkami každého proteínu. α -aminokyselina pozostáva z amino skupiny ($-\text{NH}_2$), karboxylovej skupiny ($-\text{COOH}$), vodíkoveho atómu a rozdielných tzv. R-skupín viazaných na α -uhlíkový atóm (R-skupina označuje bočný reťazec).

Prehľad kódovaných aminokyselín

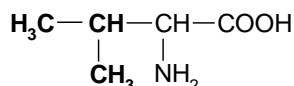


glycín, Gly

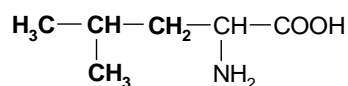
Nepolárne aminokyseliny



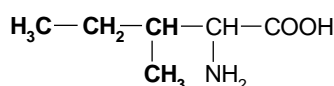
alanín, Ala



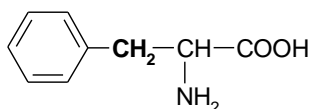
valín, Val



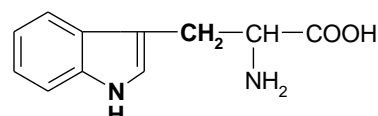
leucín, Leu



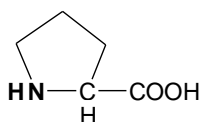
izoleucín, Ile



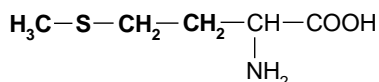
fenylalanín, Phe



tryptofán, Trp

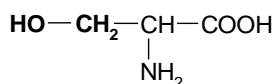


prolín, Pro

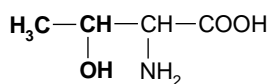


metionín, Met

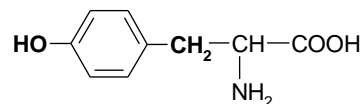
Polárne aminokyseliny



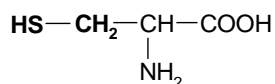
serín, Ser



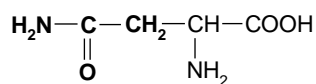
treonín, Thr



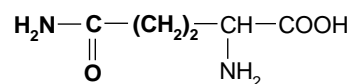
tyrozín, Tyr



cysteín, Cys

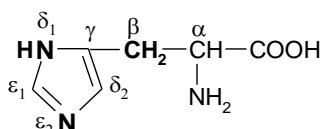


asparagín, Asn

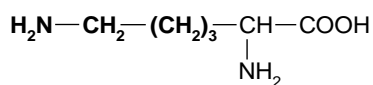


glutamín, Gln

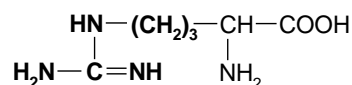
Bázické aminokyseliny



histidín, His

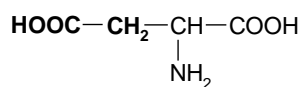


lyzín, Lys

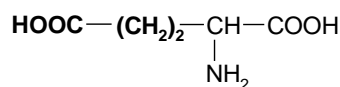


arginín, Arg

Kyslé aminokyseliny



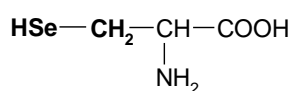
kyselina asparágová, Asp



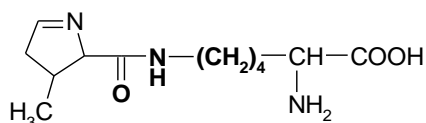
kyselina glutámová, Glu

* šedou farbou sú zvýraznené esenciálne aminokyseliny (pre človeka)

V roku 1986 bola objavená 21. a v roku 2002 aj 22. kódovaná aminokyselina, ktorými sú:



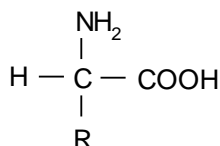
selenocysteín, Sec (U)



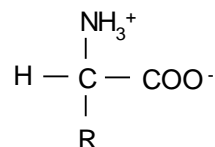
pyrrolyzín, Pyl (O)

Aminokyseliny v roztoku

Aminokyseliny sa v roztoku pri neutrálnom pH vyskytujú vo forme dipolárnych iónov – **zwitteriónov** (amfotérny ión, amfión, obojaký ión). V dipolárnej forme aminokyseliny je aminoskupina protonizovaná ($-\text{NH}_3^+$) a karboxylová skupina je disociovaná ($-\text{COO}^-$):

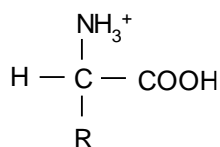
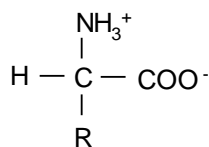
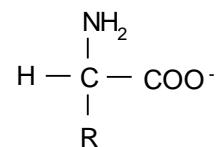


neionizovaná forma aminokyseliny



ionizovaná forma aminokyseliny

Ionizovaný stav aminokyseliny sa mení s pH:

prevládajúca forma
pri pH 1prevládajúca forma
pri pH 7prevládajúca forma
pri pH 11

TABUĽKA 1.1 pK _a hodnoty ionizovateľných skupín v proteínoch *	
Skupina	Pozorovaná pK _a
α-amino	6,8 – 8,0
α -karboxylová	3,5 – 4,3
β-karboxylová (Asp)	3,9 – 4,0
γ-karboxylová (Glu)	4,3 – 4,5
δ-guanido (Arg)	12,0
ε-amino (Lys)	10,4 – 11,1
Imidazolová (His)	6,0 – 7,0
Tiolová (Cys)	9,0 – 9,5
Fenolová (Tyr)	10,0 – 10,3

* prebrané z *Proteins: Structures and Molecular Properties*/ Thomas E. Creighton, 2. vydanie (1993)

Tetraedrálne usporiadanie štyroch rozdielnych skupín na α-uhlíkovom atóme spôsobuje optickú aktivitu aminokyselín. Dva optické obrazy aminokyselín sa nazývajú L-izomér a D-izomér. **Iba L-aminokyseliny sú súčasťou proteínov.** 20 druhov bočných reťazcov, ktoré sa líšia veľkosťou, tvarom, nábojom, chemickou reaktivitou, sa bežne nachádzajú v proteínoch. Všetky proteíny vo všetkých druhoch, od baktérie po človeka, sú konštruované z rovnakého súboru týchto 20 aminokyselín. Táto základná abeceda proteínov je stará viac ako 2 miliardy rokov. Pozoruhodný rozsah funkcií proteínov je výsledkom rozdielnych vlastností týchto 20 stavebných blokov (**tabuľka 1.1 a 1.2**).

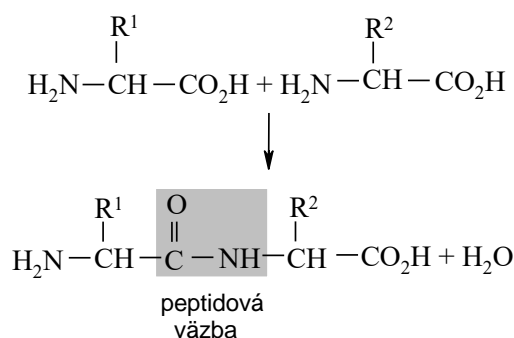
TABUĽKA 1.2 Vlastnosti jednotlivých aminokyselinových zvyškov *			
Zvyšok	Molekulová hmotnosť (g/mol)	Van der Waalsov objem (Å ³)	Frekvencia v proteínoch (%)
Ala (A)**	71,09	67	8,3
Arg (R)	156,19	148	5,7
Asn (N)	114,11	96	4,4
Asp (D)	115,09	91	5,3
Cys (C)	103,15	86	1,7
Gln (Q)	128,14	114	4,0
Glu (E)	129,12	109	6,2
Gly (G)	57,05	48	7,2
His (H)	137,14	118	2,2
Ile (I)	113,16	124	5,2
Leu (L)	113,16	124	9,0
Lys (K)	128,17	135	5,7
Met (M)	131,19	124	2,4
Phe (F)	147,18	135	3,9
Pro (P)	97,12	90	5,1
Ser (S)	87,08	73	6,9
Thr (T)	101,11	93	5,8
Trp (W)	186,21	163	1,3
Tyr (Y)	163,18	141	3,2
Val (V)	99,14	105	6,6
Vážený priemer	119,40	161	

* prebrané z *Proteins: Structures and Molecular Properties*, Thomas E. Creighton, 2. vydanie (1993)

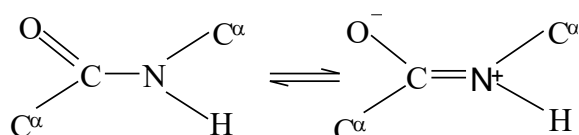
** v zátvorkách sú uvedené jednopísmenové skratky aminokyselín

Peptidová väzba

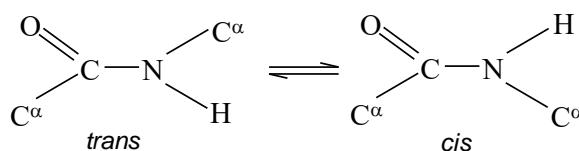
Aminokyseliny sú v proteínoch pospájané **peptidovou väzbou**, vznik ktorej je ilustrovaný na kondenzácii dvoch aminokyselín:



Peptidová väzba má charakter čiastočne dvojitej väzby v dôsledku rezonancie:



Dĺžka peptidovej väzby je iba 1,33 Å, teda je kratšia ako väzba C–N, ktorá má dĺžku 1,45 Å, avšak je dlhšia ako väzba C=N s dĺžkou 1,25 Å. Peptidová väzba má približne 40 % charakter dvojitej väzby. Dôsledkom toho je, že rotácia tejto väzby je obmedzená s veľkou tendenciou nadobúdať planárny charakter. Sú možné dve konfigurácie peptidovej väzby: jedna, pri ktorej sú atómy C^α v *trans* a druhá, pri ktorej sú v *cis* polohe:



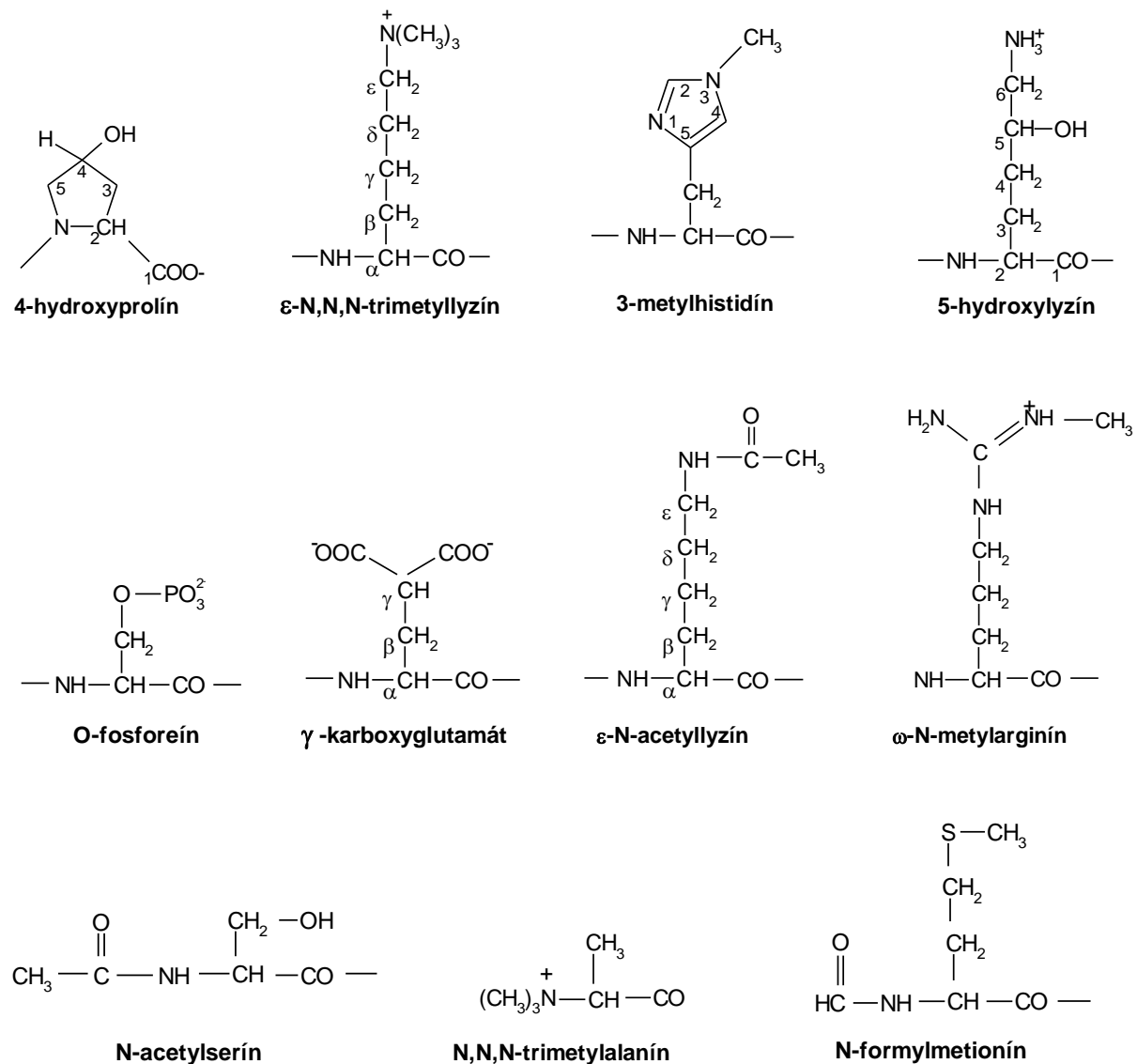
Forma *trans* je energeticky výhodnejšia zo sterických dôvodov.

Aminokyseliny je možné rozdeliť aj podľa reaktivity. Zatiaľ čo nepolárne aminokyseliny ako Gly, Ala, Val, Leu, Ile je ťažké modifikovať, iné ako Asp, Glu, Cys, Lys, Arg dávajú rôzne reakcie typické pre zlúčeniny, ktoré obsahujú karboxylovú, sulfhydrylovú, amino, guanidínovú skupinu. Tieto reakcie sa môžu využívať na relatívne selektívnu modifikáciu aminokyselinových zvyškov v proteíne – predovšetkým cysteinylový zvyšok obsahujúci sulfhydrylovú skupinu sa ľahko alkyluje, čo sa často využíva pri značení proteínov rôznymi "reportérovými" skupinami.

Väčšina aminokyselín, okrem Phe, Tyr, Trp, neabsorbujú nad 250 nm. Optické vlastnosti týchto aminokyselín sa využívajú pri stanovení koncentrácie proteínov (viď strana 27) ako aj pri štúdiu konformačných zmien proteínov. Zmena ich optických vlastností – Millonova, xantoproteínová, Ehrlichova reakcia, resp. modifikácia reaktívnych skupín bočných aminokyselinových zvyškov aromatickými skupinami (Sakaguchiho reakcia) – sa využíva aj pri kvalitatívnom určení prítomnosti týchto aminokyselín v študovaných proteínoch (**úloha 1**).

DERIVÁTY AMINOKYSELÍN V PROTEÍNOCH

Univerzálny genetický kód, ktorý je takmer totožný pre všetky známe formy života, špecifikuje iba 20 základných ("štandardných", kódovaných) aminokyselín. V určitých proteínoch boli nájdené mnohé ďalšie aminokyseliny, z ktorých sú niektoré uvedené na **obrázku 1.1**. **Tieto neobvyklé aminokyseliny, s výnimkou selenocysteínu, vznikli špecifickými modifikáciami aminokyselinových zvyškov v už syntetizovanom polypeptidovom reťazci.** Medzi najznámejšie modifikované aminokyselinové zvyšky patrí **4-hydroxyprolín** a **5-hydroxyprolín**. Oba tieto aminokyselinové zvyšky sú dôležitými štruktúrnymi zložkami vláknitého proteínu **kolagénu**, ktorý je najrozšírenejším proteínom u cicavcov. Často modifikované sú tiež aminokyseliny obsiahnuté v proteínoch, tvoriacich komplexy s nukleovými kyselinami. Napríklad ribozomálne proteíny a chromozomálne proteíny **históny** môžu byť špecificky metylované, acetylované a poprípadе i fosforylované alebo sulfurylované. **N-formylmetionín** je obyčajne začiatočným N-koncovým zvyškom pri syntéze všetkých prokaryotných proteínov, ale väčšinou je neskoršie odstránený počas tzv. maturácie (dozrievania) proteínu. **Kyselina γ -karboxyglutámová** (kyselina 2-amino-4,4-dikarboxymaslová) je obsiahnutá v niekoľkých proteínoch pôsobiacich pri zrážaní krvi.



Obrázok 1.1 (*predchádzajúca strana*) Niekoľko menej bežných zvyškov aminokyselín prítomných v proteínoch. Všetky vznikli modifikáciou niektorej z 20 základných aminokyselín v už hotovom polypeptidovom reťazci. Tie zvyšky, ktoré sú pozmenené na α -aminoskupine, sa vyskytujú na N-konci proteínu.

ZVLÁŠTNE ÚLOHY AMINOKYSELÍN

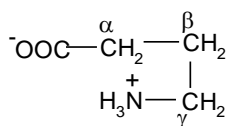
Okrem tvorby proteínov majú aminokyseliny a ich deriváty mnoho biologicky dôležitých funkcií. Niekoľko príkladov je na **obrázku 1.2**. Toto alternatívne použitie aminokyselín je typickým príkladom biologického oportunistu. *Príroda sa snaží prispôbovať už existujúce látky a pochody novým funkciám.*

Aminokyseliny a ich deriváty často pôsobia ako chemickí poslovci v komunikácii medzi bunkami. Napríklad **glycín**, **γ -aminomaslová kyselina (GABA)**, produkt dekarboxylácie glutamátu) a **dopamín** (odvodený od tyrozínu) sú nervové mediátory, teda látky uvoľňované nervovou bunkou k ovplyvneniu správania sa susedných buniek. **Histamín** (produkt dekarboxylácie histidínu) je sprostredkovateľom v alergických reakciách a **tyroxín** (derivát tyrozínu) je hormónom štítnej žľazy, obsahuje jód a všeobecne stimuluje metabolizmus stavovcov.

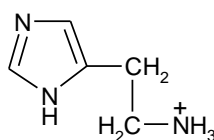
Niektoré aminokyseliny sú dôležitými medziproduktmi rôznych metabolických pochodov. Patria k nim medziprodukty biosyntézy močoviny **citruín** a **ornitín**, ďalej **homocysteín**, vyskytujúci sa v metabolizme aminokyselín a **S-adenozylmetionín**, podieľajúci sa na metylačných reakciách.

Rozmanitosť prírody je naozaj pozoruhodná. Dodnes bolo objavených v rozličných rastlinách a hubách asi 250 rôznych aminokyselín. Biologický význam väčšiny z nich je záhadný, aj keď zistená toxicita mnohých svedčí o ich úlohe pri ochrane organizmu. Mnohé z týchto aminokyselín sú jednoduchými derivátmi základných 20 aminokyselín, ale napr. **azaserín** (používaný ako antibiotikum) či **β -kyanoalanín** majú neobvyklú štruktúru.

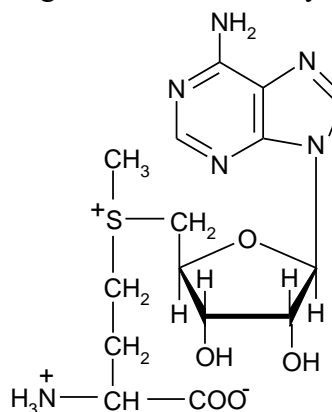
Napriek tomu, že sa v proteínoch vyskytujú len L-aminokyseliny, boli v mnohých organizmoch objavené i D-aminokyseliny. Tie sú priamo syntetizované a často sa podieľajú na stavbe bunkových stien baktérií. Možno je to tiež súčasťou ochrany bunky, pretože vďaka D-aminokyselinám je bunková stena menej ohrozená útokom **peptidáz** (enzýmami hydrolyzujúcimi peptidové väzby), ktoré rôzne organizmy používajú k natráveniu bunkových stien baktérií. D-aminokyseliny sú tiež súčasťou mnohých antibiotík, ako **valinomycínu**, **aktinomycínu D** a **gramicidínu S**.



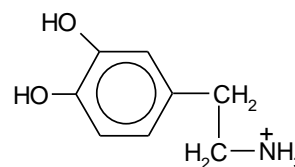
kyselina γ -aminomaslová
(GABA)



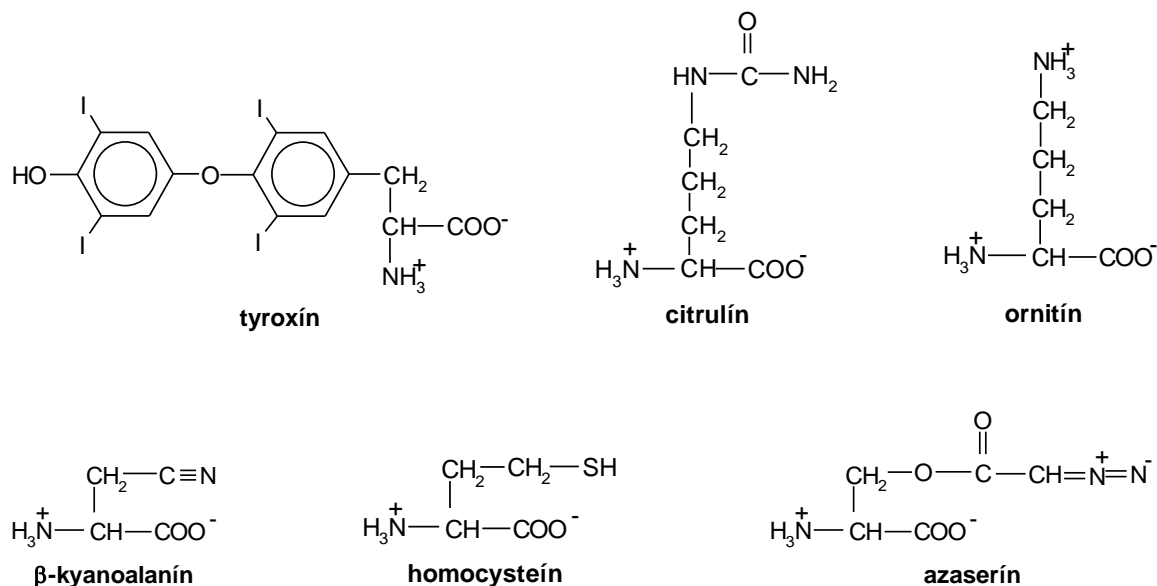
histamín



S-adenozylmetionín



dopamín



Obrázok 1.2 Niekoľko prirodzených derivátov základných aminokyselín a niekoľko aminokyselín, ktoré sa nevyskytujú v proteínoch.

IZOLÁCIA PROTEÍNOV

Na charakterizáciu proteínov z biochemického a biofyzikálneho hľadiska je potrebné relatívne veľké množstvo týchto biomakromolekúl – rádovo 1 – 10 mg.

Tieto sa získavajú izoláciou buď priamo z tkanív, kde sa nachádzajú vo väčšom množstve – týka sa to predovšetkým eukaryotických proteínov, napr. proteíny dýchacieho reťazca sa izolujú zo srdca koňa. V prípade prokaryotických proteínov sa využívajú techniky rekombinantnej DNA – vloženie génu pre daný proteín do vhodného organizmu je možné efektívne získať relatívne veľké množstvá, častokrát problematicky dostupného proteínu. Ako príklad je možné uviesť proteíny z termofilných organizmov, ktoré sa s úspechom získavajú pomocou nadprodukcie z mezofilného prokaryota *Escherichia coli* (*E. coli*).

Základný postup pri izolácii proteínov je nasledujúci:

1. Uvoľnenie proteínov z bunky

Narušenie buniek tkanív sa uskutočňuje predovšetkým mechanickou cestou pomocou homogénizátorov.

U prokaryotov sa oslabuje bunková stena natrávením polysacharidov spevňujúcich bunkovú stenu pomocou lysozýmu. Na skvapalnenie viskózneho roztoku, ktorý je spôsobený polysacharidmi a deoxyribonukleovými kyselinami, sa pridáva DNáza I. V tejto fáze sa pridávajú do roztoku aj inhibítory proteáz, ktoré by po uvoľnení z bunky mohli naštiepiť izolovaný proteín. Rozrušenie membrány sa uskutočňuje metódou zmrazovania a rozmrazovania (*freeze and thaw*), ktorej podstatou je, že vznikajúce kryštáliky roztoku počas fázy zmrazovania mechanicky narušajú bunkovú stenu. Inou metódou je inkubácia bunkovej pasty v tlakovej fľaši (30 – 60 min) pod tlakom 150 atmosfér. Následné vytlačenie tejto suspenzie cez úzky otvor spôsobí v dôsledku strižných síl, pôsobiach na bunkovú stenu, jej narušenie.

Zvyšky membrán a nerozpustné častice sa odstránia centrifugáciou. Proteín, ktorý nás zaujíma, sa nachádza väčšinou v supernatante. Supernatant – kvapalná časť v centrifugačnej

skúmavke sa odloží pre ďalšie spracovanie a pelet – tuhá časť nachádzajúca sa na dne centrifugačnej skúmavky – sa vyhodí.

2. Ďalší postup v izolácii závisí od vlastností izolovaného proteínu. Najbežnejšie metódy sa zakladajú na princípe:

- a) rozličnej rozpustnosti proteínových zložiek zmesi,
- b) rôznej stability proteínov,
- c) interakcie proteínov so špecifickými zrážacími činidlami,
- d) použitia špecifických adsorbentov.

Týmito metódami sa väčšinou nezíska homogénna proteínová frakcia, ale sú iba hrubým spôsobom rozdelenia základnej zmesi.

2a Delenie proteínov na základe ich rozličnej rozpustnosti

Rozpustnosť proteínov ovplyvňujú štyri základné faktory. Je to **prítomnosť solí, organických rozpúšťadiel, pH a teplota**. Všetky tieto faktory sa môžu využiť pri delení proteínov na základe ich rozpustnosti.

Rozpustnosť globulárnych proteínov závisí od **iónovej sily roztoku**. Na základe minimálnej koncentrácie rôznych neutrálnych solí potrebných na precipitáciu daného proteínu, boli anióny a kationy usporiadané do tzv. **Hofmeisterovej série** (Hofmeister, 1888).

Hofmeisterova séria

kozmotropné (vysol'ovanie)

chaotropné (vsol'ovanie)

anióny: $F^- > PO_4^{3-} > SO_4^{2-} > CH_3COO^- > Cl^- > Br^- > I^- > SCN^- > ClO_4^-$

kationy: $(CH_3)_4N^+ > (CH_3)_2N_2^+ > NH_4^+, K^+, Na^+, Cs^+ > Li^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Ba^{2+}$

Obrázok 1.3 Usporiadanie iónov podľa ich schopnosti vysol'ovať proteíny. *Poznámka:* Uvedená Hofmeisterova séria nie je absolútna – efektívnosť (poradie v Hofmeisterovej sérii) jednotlivých solí ovplyvňovať rozpustnosť a iné vlastnosti proteínov sa môžu prípad od prípadu mierne odlišovať.

Len málo proteínov je rozpustných v destilovanej vode, nízka koncentrácia elektrolytu zvyšuje ich rozpustnosť. Zvýšenie rozpustnosti pridaním nízkej koncentrácie soli sa nazýva **vsol'ovanie** (*salting-in effect*). Efekt vsol'ovania možno využiť pri delení proteínov tak, že sa zmes proteínov postupne extrahuje roztokmi s narastajúcou koncentráciou soli, prípadne sa roztok proteínov podrobí dialýze a precipitát (zrazenina) sa oddelí odstredením (scentrifugovaním). Takto možno deliť napr. albumíny od globulínov (**úloha 5**).

Pri delení proteínov zmenou koncentrácie elektrolytu sa v oveľa väčšej miere uplatňuje **vysol'ovanie** (*salting-out effect*), pri ktorom sa používa vysoká koncentrácia soli. Najvyšší vysol'ovací efekt majú multivalentné ióny, predovšetkým fosfát a síran. Síran sa najčastejšie používa vo forme amónnej alebo sodnej soli. Soľ sa môže pridávať ako nasýtený roztok, alebo ako tuhá substancia. Postupným zvyšovaním koncentrácie soli a následným odstredením vyzrážanej frakcie možno rozdeliť zmes na niekoľko frakcií. Pri vysol'ovaní však treba dodržiavať dve zásady:

1. Soľ sa musí pridávať pomaly, bez vzniku vysokej lokálnej koncentrácie soli, pri ktorej sa predčasne vyzráža časť niektorej frakcie.

2. Po pridaní celého množstva soli treba zmes ešte 15 až 30 minút premiešavať, čím sa dosiahne kompletná precipitácia.

Frakcionácia proteínov vysol'ovaním má veľkú výhodu v tom, že sa môže použiť neobmedzený objem vzorky.

Proteíny sa dajú z roztoku vyzrážať **organickými rozpúšťadlami**, ktoré sa miešajú s vodou, napr. acetón a etanol. Pri tomto spôsobe zrážania proteínov vzniká nebezpečenstvo ich denaturácie, preto sa obyčajne pracuje pri nízkych teplotách. Zmenou koncentrácie organického rozpúšťadla v roztoku od 0 do 80 % možno získať niekoľko proteínových frakcií. Príkladom použitia etanolu na takúto frakcionáciu je delenie plazmatických proteínov alkoholovou frakcionáciou. Acetón sa používa napr. pri delení proteínov kostrového svalu, amylázy a pod.

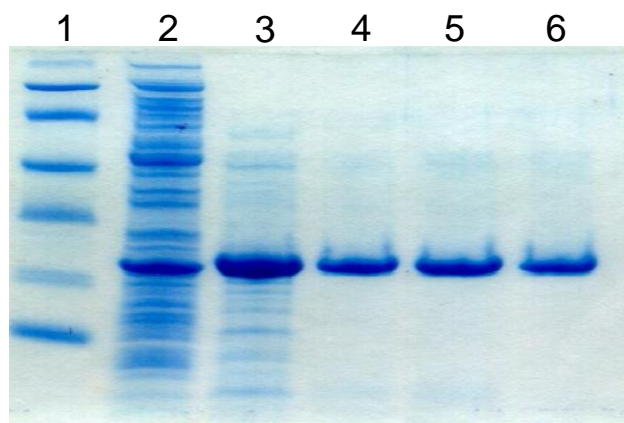
Rozpustnosť proteínov ovplyvňuje aj **pH prostredia**. Vyplýva to z amfotérnej štruktúry proteínov. Celkový náboj ich molekuly je súčet nábojov jednotlivých nabitých skupín. Pri určitom pH sa dosiahne taká disociácia polárnych skupín, že **celkový náboj molekuly je nulový (izoelektrický bod)**. Rozpustnosť proteínu v izoelektrickom bode je nízka, a preto ľahko precipituje. Len málo proteínov sa vyzráža z roztoku v izoelektrickom bode bez akéhokoľvek vedľajšieho zásahu, napr. kazeín z mlieka pri pH 4,5. Treba použiť ešte nejaký iný zrážací faktor, napr. neutrálne soli, organické rozpúšťadlo a pod. Pri delení proteínov zrážaním v izoelektrickom bode treba brať do úvahy aj to, že niektoré proteíny v izoelektrickom bode ľahko podliehajú denaturácii.

2b Delenie proteínov na základe ich rozličnej stability

Proteíny sa líšia v citlivosti na tepelnú denaturáciu. Niektoré z nich sa rýchlo denaturujú už pri laboratórnej teplote, iné zasa vydržia aj krátky var. Táto vlastnosť sa môže využiť pri frakcionácii, keď je izolovaný proteín tepelne stabilný. Zahriatím roztoku delenej zmesi sa kontaminujúce proteíny denaturujú a môžu sa oddeliť. Delenie sa často robí v prítomnosti stabilizátora, ktorý zvyšuje stabilitu izolovaného proteínu. Príkladom je izolácia α -amylázy, kedy sa ako stabilizátor používajú ióny vápnika, pričom proteázy a β -amyláza sa teplom denaturujú.

Iným príkladom je izolácia elongačného faktora Ts z *Thermus thermophilus* (fyziologická teplota 70–75 °C) po jeho nadprodukcii v *Escherichia coli* (fyziologická teplota 37 °C).

Pri frakcionácii proteínov tepelnou denaturáciou treba rátať s tým, že denaturované proteíny môžu po vychladnutí renaturovať (späťne sa zbaľovať), preto treba koagulát čo najrýchlejšie oddeliť. Ďalej pri zahrievaní je čas vyhriatia roztoku rozdielny podľa toho, či sa pracuje s malým, alebo veľkým objemom. Keďže stupeň denaturácie



Obrázok 1.4 Kontrola čistoty proteínu po jednotlivých krokoch pri izolácii EF-Ts z *T. thermophilus* nadprodukovaného v *E. coli* pomocou SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Stĺpec:

- 1 – štandardy s danou molekulovou hmotnosťou,
- 2 – supernatant po rozbití buniek a scentrifugovaní nerozpustných častí,
- 3 – po zahriatí supernatantu na 70 °C počas 10 min (výrazný úbytok pásov zodpovedá úbytku "znečisťujúcich" proteínov),
- 4 – po anión-výmennej chromatografii,
- 5 – po kation-výmennej chromatografii,
- 6 – koncový produkt – čistý proteín.

závisí aj od času zahrievania, je vhodné pracovať so štandardným objemom vzorky.

Druhý spôsob diferenciálnej inaktivácie je spracovanie zmesi proteínov v extrémnych podmienkach pH, v ktorých nastáva selektívna denaturácia kontaminujúcich proteínov. Izolovaný proteín však musí byť v týchto podmienkach stály. Príkladom je izolácia ribonukleázy z pankreasu roztokom H_2SO_4 s koncentráciou $0,12 \text{ mol/dm}^3$, kedy sa podstatná časť sprievodných proteínov denaturuje.

2c Delenie proteínov interakciou so špecifickými proteínovými zrážadlami

Veľa proteínov sa vyzráža **sol'ami ťažkých kovov**. Vyzrážaný proteín môže zostať aktívny, alebo sa môže denaturovať, čo sa využíva pri ich delení. Ak sa proteín, ktorý sa má izolovať takouto soľou zráža a nedenaturuje sa, postupuje sa tak, že sa proteín zo zmesi po vyzrážaní oddelí a soľ ťažkého kovu sa odstráni dialýzou, chelátovým činidlom, prípadne ionexom. V prípade, že sa izolovaný proteín soľou ťažkého kovu nezráža, môže sa takto oddeliť časť balastových (nechcených) proteínov, vyzrážaných použitou soľou. Tento spôsob frakcionácie je dosť obmedzený pre enzýmy, pretože soli ťažkých kovov sú vo všeobecnosti inhibítormi enzýmov.

Zmes proteínov sa môže frakcionovať aj niektorými kyselinami, napr. kyselinou trichlóroctovou, sulfosalicylovou a pod. Niektoré proteíny, napr. glykoproteíny účinkom týchto kyselín precipitujú ťažko, čím sa môžu oddeliť od vyzrážaných proteínov.

2d Delenie proteínov adsorpčnou chromatografiou

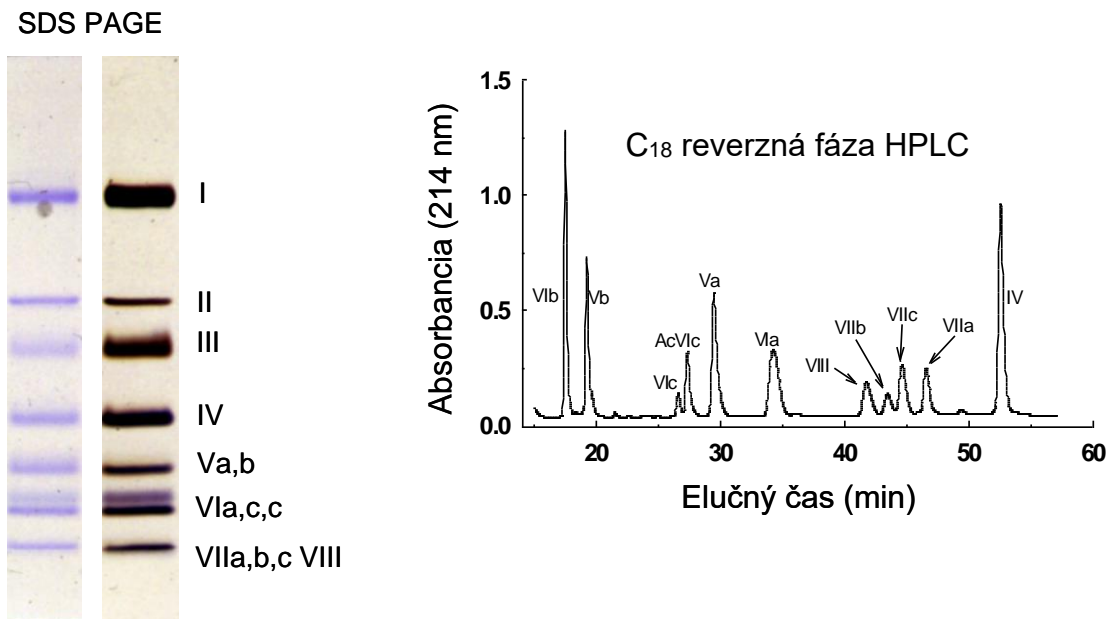
Proteíny sa dajú deliť aj na povrchoch niektorých tuhých látok, ktoré sú schopné **reverzibilne viazať** určité molekuly proteínov. Medzi takéto adsorbenty patria hydratovaný oxid hlinitý, kalciumfosfátový gél (hydroxyapatit), aktívne uhlie, kremičitý gél, niektoré zeminy a pod. Z nich najčastejšie používaným je hydroxyapatit. Delenie sa robí tak, že sa adsorbent mieša s roztokom proteínov, čím dochádza k ich adsorpcii. Keď sa na adsorbent viaže proteín, ktorý sa má pripraviť v čistom stave, adsorbent sa odstredí a naviazaný proteín sa vytesní vhodným tlmivým roztokom. Ak sa na adsorbent viažu iba balastové proteíny, po odstredení adsorbentu zostáva proteín v roztoku.

Adsorpciu proteínov ovplyvňujú viaceré faktory, napr. pH, iónová sila, teplota a pod. Preto pri použití tejto deliacej metódy sa musia empiricky zistiť vhodné podmienky pre jednotlivé použité adsorbenty a delené proteíny. Platí to aj pre desorpciu proteínu z adsorbentu. Pri desorpcii sa najčastejšie používa zmena pH a iónovej sily roztoku.

Ďalšie metódy delenia proteínov

Modernejšie/jemnejšie metódy používané pri izolácii čistých proteínov, využívajú viaceré fyzikálno-chemické a biologické vlastnosti týchto makromolekúl. Patria sem **chromatografické** a **elektroforetické** metódy. **Chromatografické metódy** využívajú rozdielny náboj proteínových molekúl (ionexová chromatografia), rôznu veľkosť molekúl (gélová filtračná chromatografia), rozdielne izoelektrické body (chromatofokusácia), schopnosť špecificky reagovať s niektorými látkami (afinitná chromatografia), rozličnú rozpustnosť (upravená rozdeľovacia chromatografia), ako aj rozličné množstvo nepolárnych hydrofóbných skupín (hydrofóbná chromatografia).

Elektroforetické metódy využívajú rozdielny elektrický náboj molekúl proteínov na ich rozdelenie v elektrickom poli. Napríklad elektroforéza na nosičoch, izoelektrická fokusácia, izotachoforéza a metódy, ktoré kombinujú chromatografické a elektroforetické delenia.



Obrázok 1.5 Ukážka/porovnanie dvoch metód pri analýze zloženia 13-subjednotkového (I, II, III, IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc, VIII) membránového proteínu *cytochróm c oxidázy* z hovädzích sŕdc (Prof. Neal C. Robinson, The University of Texas Health Science Center at San Antonio).

Vľavo: SDS-PAGE – ukážka „zviditeľnenia“ proteínov pomocou farbiva *Coomassie Brilliant Blue* (modré pružky) a pomocou farbenia striebrom (hnedé pružky).

Výhoda – v princípe možnosť detekcie všetkých subjednotiek.

Nevýhoda – prekrývajúce sa pásy; práca, u niektorých subjednotiek prakticky nemožná kvantitatívna analýza.

Vpravo: chromatografické delenie (*reversed phase HPLC*).

Výhoda – rýchla a kvantitatívna analýza subjednotiek.

Nevýhoda – neschopnosť analyzovať niektoré subjednotky (v danom prípade subjednotky I až III).

METÓDY URČOVANIA MNOŽSTVA (KONCENTRÁCIE) PROTEÍNOV

Je užitočné, často však nie nevyhnutné, určiť celkové množstvo proteínov v každom stupni izolácie proteínu. V praxi je zvyčajne dôležitejšia biologická alebo biochemická aktivita frakcií. Avšak, za istých okolností je nevyhnutné poznať obsah proteínu, napríklad, pri určení stupňa čistoty daného proteínu po určitom kroku jeho izolácie, alebo pri určení špecifickej koncentrácie finálneho produktu. Navyše, isté kroky izolácie sú veľmi citlivé na koncentrácie proteínu.

Počas mnohých rokov štúdia proteínov boli popísané viaceré metódy na určovanie množstva proteínov. Zo starších metód je najvýznamnejšia metóda určenia dusíka pomocou Kjeldahlovej metódy. K novším metódam patria infračervená spektroskopia, turbidimetria, fluorimetria, refraktometria a polarografia. Ak je známa primárna sekvencia študovaného proteínu, tak z analýzy aminokyselinového zloženia je možné získať presné kvantitatívne údaje.

Treba však mať na pamäti, že niektoré aminokyseliny, špeciálne Trp, Cys a cystín (Cys–Cys), sú zvlášť citlivé na kyslú hydrolyzu, čo je dôležité brať do úvahy pri spracovaní údajov. Navyše, Gln a Asn sa pri kyslej hydrolyze menia na zodpovedajúce kyseliny Glu a Asp. V praxi však častokrát, predovšetkým v prípade prvýkrát izolovaných proteínov, nie je známa primárna sekvencia aminokyselín izolovaného proteínu.

Najbežnejšie súčasné metódy na určovanie koncentrácie proteínov sú založené na ich absorpcii žiarenia v UV oblasti alebo vo viditeľnej oblasti spektra po chemickej reakcii za vzniku chromofórov (**úloha 3 a 7**).

Je dôležité si zapamätať, že všetky tieto metódy sú semikvantitatívne, ak nie sú štandardizované na proteín, ktorého koncentráciu určujeme. Je taktiež dôležité si uvedomiť, že reakcia proteínu s prítomným farbivom závisí od aminokyselinového zloženia proteínu a môže byť ovplyvnená prítomnosťou neproteínovej prostetickej skupiny, napr. sacharidovej zložky. Preto, takmer univerzálne použitie hovädzieho sérového albumínu (*BSA - bovine serum albumin*) ako štandardného proteínu nie je úplne uspokojujúce a je žiaduce, kde je to možné, kalibrovať danú metódu použijúc proteín, ktorého koncentráciu určujeme.

UV spektrofotometria

Meranie v ďalekej UV oblasti

Peptidová väzba v proteínoch a peptidoch má dobre definované absorpčné maximum pri 191 – 194 nm. Táto metóda je dostatočne citlivá – vyžaduje cca 0,01 – 0,05 mg proteínu a relatívne nezávislá na aminokyselinovom zložení proteínu. Problém je, že v tejto oblasti vlnových dĺžok absorbuje už aj kyslík, preto sa používa vlnová dĺžka 205 nm. **Absorbancia proteínového roztoku s koncentráciou 1 mg/ml pri 205 nm je okolo 30.** Isté odchýlky od tejto hodnoty spôsobuje Tyr a Trp, preto je nutné urobiť korekciu extinkčného koeficientu (mólového absorpčného koeficientu, ϵ) na prítomnosť Tyr a Trp v proteíne podľa vzťahu:

$$\epsilon_{205}^{1\text{mg/ml}} = 27,0 + 120 \cdot A_{280}/A_{205}$$

Pri tejto metóde je nevyhnutné používať kremenné (*quartz*) kyvety a tlmivé roztoky s minimálnou absorbanciou pri tejto vlnovej dĺžke (pozri <http://kosice.upjs.sk/~kbch/document.php?name=labsamples&lang=sk>).

Meranie pri 280 nm

Väčšina proteínov absorbuje pri 280 nm v dôsledku prítomnosti fenolovej skupiny Tyr a indolovej skupiny Trp. Extinkčný koeficient sa zvyčajne vyjadruje v tvare $\epsilon_{280}^{1\%}$ ($\epsilon_{280}^{10\text{mg/ml}}$), príp. $\epsilon_{280}^{1\text{mg/ml}}$ ($\epsilon_{280}^{0,1\%}$) a predstavuje špecifický absorpčný koeficient. Inými slovami, ide o **absorbanciu jednopercentného roztoku v jednocentimetrovej kyvete** pri danej vlnovej dĺžke (v tomto prípade 280 nm).

Hodnoty $\epsilon_{280}^{1\text{mg/ml}}$ ležia pre väčšinu proteínov v rozmedzí 0,4 – 1,5, ale napríklad pre parvalbumín a Ca^{2+} -príbuzné proteíny $\epsilon_{280}^{1\text{mg/ml}} = 0,0$ a lyzozým 2,65. Metóda je dosť nepresná, ak proteín nie je v relatívne čistej forme a ak samotná metóda nie je kalibrovaná na tento proteín. Táto metóda je relatívne necitlivá a na zmysluplné určenie absorbancie vyžaduje 0,05 až 2 mg proteínu. Je však veľmi citlivá na komponenty, ktoré absorbujú pri 280 nm, špeciálne na látky obsahujúce purínový alebo pyrimidínový kruh (nukleové kyseliny, nukleozidy). V takom prípade je potrebné absorbanciu pri 280 nm korigovať podľa nasledujúcej rovnice:

$$\text{proteín(mg/ml)} = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260}$$

Ak samotný roztok bez proteínu absorbuje žiarenie s vlnovou dĺžkou 280 nm, je potrebné odčítať hodnotu absorpcie tohto roztoku od absorpcie vzorky obsahujúcej meraný proteín. Vo všeobecnosti roztok bez analyzovanej látky (v tomto prípade bez proteínu) nazývame porovnávací roztok, príp. *blank* (z angl. prázdny). Zvykom je tiež používať výrazy referencia alebo pozadie.

Veľká výhoda tejto metódy je jej rýchlosť a to, že je nedeštruktívna, teda meraná vzorka môže byť využitá na ďalšie experimenty. Pri tejto metóde je taktiež nevyhnutné používať kremenné kyvety.

Edelhochova metóda

Je oveľa presnejšia ako predchádzajúce, avšak je potrebné poznať množstvo Tyr, Trp a cystínov v proteíne. Metóda je založená na tom, že neznámy parameter, teda blízke okolie Tyr a Trp v natívnom proteíne, ktoré ovplyvňuje extinkčné koeficienty týchto chromofórov sú "normalizované" na jednotné prostredie – 6 M guanidium HCl (GdmHCl), v ktorom sú proteíny rozbalené a tyrozinylové a tryptofanylové zvyšky sú vystavené solventu.

Postup určenia množstva proteínu spočíva v nasledujúcich krokoch:

(i) určí sa teoretický extinkčný koeficient proteínu v 6 M guanidín HCl pri 280 nm na základe známeho počtu #Tyr, #Trp a #cystínov v proteíne a extinkčných koeficientov $\epsilon_{280}(\text{Tyr})$, $\epsilon_{280}(\text{Trp})$ a $\epsilon_{280}(\text{cystínov})$ v 6 M GdmHCl, ktoré sú $1\,285\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, $5\,685\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a $125\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, podľa vzťahu:

$$\epsilon_{280\text{ v }6\text{ M GdmHCl}} (\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}) = 5\,685 \cdot \#\text{Trp} + 1\,285 \cdot \#\text{Tyr} + 125 \cdot \#\text{cystín}$$

(ii) určí sa absorpcia proteínu pri 280 nm v 6 M GdmHCl, $A_{280\text{ v }6\text{ M GdmHCl}}$,

(iii) koncentrácia proteínu c sa určí z pomeru:

$$c_{280\text{ v }6\text{ M GdmHCl}} = A_{280\text{ v }6\text{ M GdmHCl}} / \epsilon_{280\text{ v }6\text{ M GdmHCl}}$$

(iv) následne môžeme určiť extinkčný koeficient pre natívny proteín $\epsilon_{280\text{ v pufrí}} (\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$ tak, že určíme absorpciu $A_{280\text{ v pufrí}}$ pre to isté množstvo proteínu v rovnakom objeme tlmivého roztoku ako bol v bode (ii) použitý pri meraní extinkčného koeficientu v 6 M GdmHCl podľa vzťahu:

$$\epsilon_{280\text{ v pufrí}} = A_{280\text{ v pufrí}} / c_{280\text{ v }6\text{ M GdmHCl}}$$

Pre presné meranie je dôležité merať absorpčné spektrum v tlmivom roztoku a v 6 M GdmHCl nie iba pri 280 nm, ale minimálne v oblasti 250 až 350 nm, aby sme odhalili prípadnú agregáciu, ktorá sa prejavuje rozptylom svetla a zvyšuje zdanlivú absorpciu v oblasti 280 nm. Ak sa v týchto roztokoch pozoruje absorpcia nad $\sim 325\text{ nm}$, potom absorpcia určená pri 280 nm musí byť korigovaná na rozptyl svetla niektorým z nasledujúcich spôsobov:

- (i) $A_{280\text{nm korigovaná}} = A_{280\text{nm nameraná}} - 1,929 \cdot A_{330\text{nm nameraná}}$
(ii) $A_{280\text{nm korigovaná}} = A_{280\text{nm nameraná}} - 2,0 \cdot A_{333\text{nm nameraná}}$

Metóda podľa Pace a kol. (1995)

Na základe vzorky 116 extinkčných koeficientov nameraných pre 80 proteínov vo vode bol určený empirický vzťah na určenie extinkčného koeficientu natívneho proteínu pri 280 nm iba na základe počtu #Tyr, #Trp a #cystínov v proteíne:

$$\varepsilon_{280} (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) = 5\,500 \cdot \#\text{Trp} + 1\,490 \cdot \#\text{Tyr} + 125 \cdot \#\text{cystín}$$

Takto určený $\varepsilon_{280} (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ je spoľahlivý pre proteíny, ktoré obsahujú Trp zvyšky a menej spoľahlivý pre tie proteíny, ktoré tryptofány neobsahujú.

Biuretova metóda

V alkalickom prostredí sa meďnatý kation viaže na dusík peptidov a proteínov za vzniku komplexu s absorpčným maximom pri 540 – 560 nm. Nedochádza k interferencii s voľnými aminokyselinami a existuje iba malá závislosť na primárnej štruktúre proteínu, keďže meď reaguje s peptidovým reťazcom a nie s bočnými skupinami. Odporúčaný postup je uvedený v **tabuľke 1.3**.

TABUĽKA 1.3 Biuretova metóda

1. Pripravíme Biuretovo činidlo tak, že rozpustíme 1,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 6 g vianu sodno-draselného v 500 ml vody. Pridáme 10 % w/v hydroxidu sodného a doplníme vodou do 1 litra.
 2. Uskladníme činidlo v plastovej fľaši na tmavom mieste. Činidlo vydrží veľmi dlho ($t \rightarrow \infty$), ak k nemu pridáme 1 g jodidu draselného, ktorý zabráni redukcii meďnatých iónov.
 3. K vzorke s objemom 0,5 ml, ktorá obsahuje až do 3 mg proteínu, pridáme 2,5 ml Biuretovho činidla.
 4. Necháme stáť 30 minút.
 5. Meriame absorbanciu pri 540 nm. Porovnávací roztok obsahuje 0,5 ml tlmivého roztoku a 2,5 ml Biuretovho činidla.
-

Najväčšou nevýhodou tejto metódy, ktorá výrazne obmedzuje jej použiteľnosť je **nízka citlivosť** (1 – 6 mg proteínu/ml). Citlivosť metódy môže byť zvýšená: **(i)** separáciou komplexu meď-proteín gélovou filtráciou s následným uvoľnením medi z komplexu a jej kolorimetrickým určením, **(ii)** meraním absorbancie štandardnej Biuretovej reakcie v blízkej UV oblasti pri 310 nm. Niektoré tlmivé roztoky predovšetkým tie na báze Tris-u môžu interferovať s Biuretovou reakciou, ako aj tie, ktoré obsahujú amóniový kation, čo značne komplikuje meranie frakcií získaných po precipitácii síranom amónnym.

Lowryho metóda

Patrí k najbežnejšie používaným metódam na stanovenie koncentrácie proteínu. Základom metódy je Biuretova reakcia proteínu s meďou v alkalickom prostredí a redukcia Folin-Ciocalteu fosfomolybdenofosfowolfrámovej kyseliny na heteropolymolybdénovú modrú, v dôsledku meďou katalyzovanej oxidácie aromatických aminokyselinových zvyškov. Reakcia má za následok vznik intenzívnej modrej farby a je citlivejšia (0,1 – 1 mg proteínu/ml) v porovnaní s Biuretovou metódou. Odporúčaný postup je uvedený v **tabuľke 1.4**.

TABUĽKA 1.4 Lowryho metóda

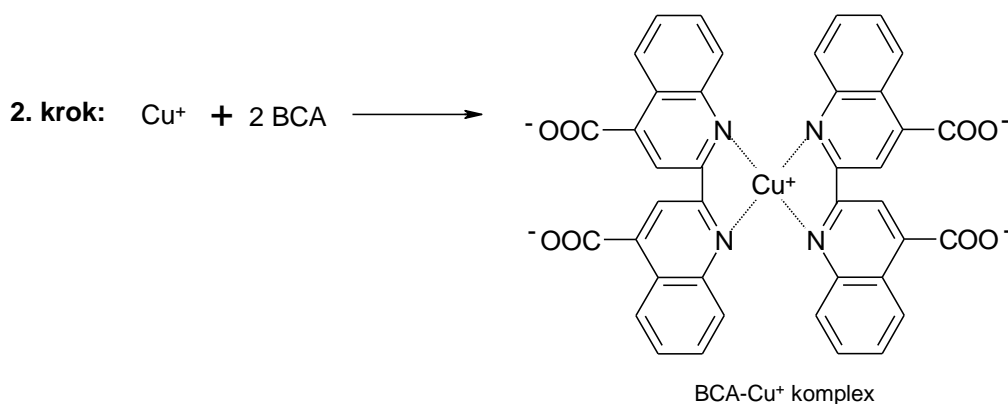
1. Zásobné roztoky činidiel: **A**, 1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; **B**, 2 % w/v vínan sodno-draselný; **C**, 0,2 M hydroxid sodný; **D**, 4 % w/v uhličitan sodný. Tieto činidlá sú stabilné pri izbovej teplote.
2. Do 49 ml činidla **C** pridaj 49 ml činidla **D**. Potom pridaj 1 ml činidla **A** a následne 1 ml činidla **B**. Tento meďnato-alkalický roztok (činidlo **E**) musí byť pripravované vždy čerstvé.
3. Do 10 ml Folin-Ciocalteu činidla pridaj 10 ml vody. Toto je činidlo **F**.
4. Do 0,5 ml vzorky obsahujúcej až do 0,5 mg proteínu pridaj 2,5 ml činidla **E**.
5. Zmiešaj a nechaj reagovať 10 minút.
6. Pridaj 0,25 ml činidla **F**.
7. Zmiešaj a nechaj reagovať 30 minút.
8. Zmeraj absorbanciu pri 750 nm. Porovnávací roztok obsahuje 0,5 ml tlmivého roztoku opracovaného podľa bodov 4 až 7.

Treba poznamenať, že reakcia je veľmi citlivá na pH prostredia – je preto potrebné udržať pH v rozmedzí 10,0 – 10,5. V dôsledku variability zásobného roztoku Folin-Ciocalteu činidla je dôležité pre každý zásobný roztok nájsť vhodné riedenie na dosiahnutie finálneho pH. Navyše, na dosiahnutie reprodukovateľných výsledkov je dôležité dodržiavať jednotlivé časové intervaly pridávania a zmiešavania jednotlivých činidiel.

Reakcia iba mierne závisí na aminokyselinovom zložení proteínu. Na druhej strane však s danou reakciou môže interferovať viacero látok. K týmto zlúčeninám patria amino deriváty, aminokyseliny, tlmivé roztoky, detergenty, lipidy, sacharidy, nukleové kyseliny, soli a sulfhydrylové zlúčeniny (existujú zoznamy testovaných látok a ich množstvá tolerovateľné pre použitie tejto metódy). Špeciálnym problémom je prítomnosť detergentov (aniónových, zwitteriónových a neiónových) kvôli ich častému použitiu pri rozpúšťaní proteínov. Pre roztoky, ktoré obsahujú detergenty sú vyvinuté rôzne variácie Lowryho metódy. Ďalším často prehliadaným problémom tejto metódy je nelinearita kalibračnej krivky.

BCA (bicinchoninic acid) metóda

Množstvo problémov spojených s Lowryho metódou spočíva vo vlastnostiach detekčného činidla (Folin-Ciocalteu). Preto bola vyvinutá metóda založená na alternatívnom detekčnom činidle, kyseline bicinchoninovej (BCA). Princíp metódy:



Reakcia dáva intenzívne fialové sfarbenie s maximom absorbancie pri 562 nm. Citlivosť BCA metódy (0,1 – 1,2 mg proteínu/ml) je podobná ako v prípade Lowryho metódy. Odporúčaný postup je uvedený v **tabuľke 1.5A**. Bola taktiež vyvinutá presnejšia metóda, tzv. *BCA micro*-

assay metóda (0,5 – 10 µg proteínu/ml), ktorej postup je uvedený v **tabuľke 1.5B**.

TABUĽKA 1.5A BCA metóda

1. Zásobné roztoky činidiel: **A**, 1 % w/v BCA-Na₂, 2 % w/v Na₂CO₃, 0,16 % w/v vínan sodný, 0,4 % w/v NaOH a 0,95 % NaHCO₃. Ak je potrebné, 50 % w/v NaOH alebo pevný NaHCO₃ na úpravu pH na hodnotu 11,25. **B**, 4 % w/v CuSO₄·5H₂O. Činidlá A a B sú stabilné pri izbovej teplote.
 2. Činidlo **C** sa pripraví zmiešaním 100 objemových dielov činidla A a 2 obj. dielov činidla B. Činidlo C je jablkovo zelené a je stabilné 1 týždeň pri izbovej teplote.
 3. Do 100 µl vzorky obsahujúcej 10 – 120 µg proteínu (0,1 – 1,2 mg proteínu/ml) pridaj 2 ml činidla C.
 4. Zmiešaj a nechaj stáť 30 min pri 37 °C.
 5. Zmeraj absorbanciu pri 562 nm. Porovnávací roztok obsahuje 100 µl tlmivého roztoku opracovaného podľa bodov 3 a 4.
-

TABUĽKA 1.5B BCA *microassay* metóda

1. Zásobné roztoky činidiel: **A**, 8 % w/v Na₂CO₃, 1,6% w/v NaOH, 1,5 % w/v vínan sodný a dostatočné množstvo pevného NaHCO₃ na úpravu pH na hodnotu 11,25. **B**, 4 % w/v BCA-Na₂. Činidlá A a B sú stabilné pri izbovej teplote. Činidlo **C**, 4 obj. diely CuSO₄·5H₂O zmiešané so 100 obj. dielmi činidla B. Toto činidlo by malo byť pripravené vždy čerstvé.
 2. Zásobný roztok činidla **D** sa pripraví v čase potreby zmiešaním 1 obj. dielu činidla C s 1 obj. dielom činidla A.
 3. Do 1 obj. dielu vzorky (0,5 – 10 µg proteínu/ml) pridaj 1 obj. diel činidla D.
 4. Zmiešaj a nechaj stáť 60 min pri 60 °C.
 5. Ochlad' na izbovú teplotu.
 6. Zmeraj absorbanciu pri 562 nm. Porovnávací roztok obsahuje 100 µl tlmivého roztoku opracovaného podľa bodov 3 až 5.
-

Pretože mechanizmus BCA metódy je v blízkom vzťahu s Lowryho metódou, dá sa očakávať podobná citlivosť obidvoch metód na aminokyselinové zloženie proteínu. Špeciálnou výhodou BCA metódy je vo všeobecnosti jej väčšia tolerancia voči zlúčeninám, ktoré interferujú s Lowryho metódou. BCA metóda je menej citlivá na prítomnosť rôznych detergentov (aniónových, neiónových a zwiteriónových), ktoré sa často používajú pri rozpúšťaní proteínov. Denaturačné činidlá – ako GdmHCl a močovina sú tiež dobre tolerované, avšak BCA metóda je citlivejšia na prítomnosť redukujúcich cukrov. Samozrejme, med'-chelatujúce činidlá ako napr. EDTA, sú vážnym problémom pre obidve metódy, podobne ako aj činidlá, ktoré ovplyvňujú pH činidiel používaných v BCA a Lowryho metóde, a tým ovplyvňujú optimálne pH daných metód.

Bradfordova metóda – viazanie farbiva

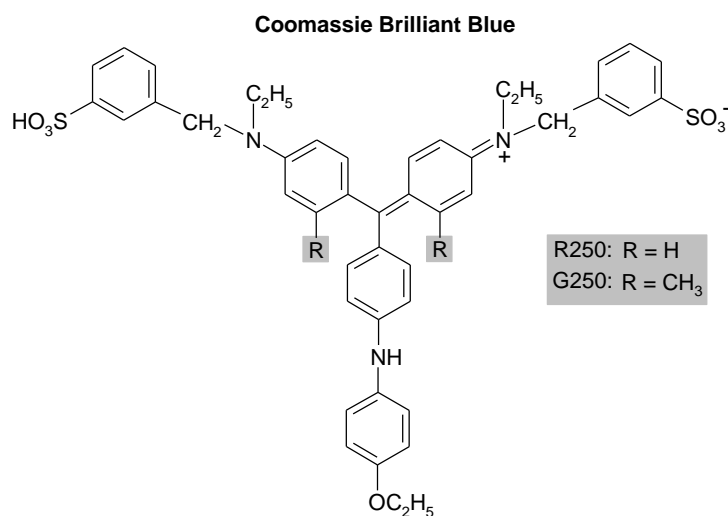
Za vhodných podmienok, kyslé a bázické skupiny proteínov interagujú s disociovanými skupinami organických farbív za vzniku farebných zrazenín. Tento jav môže byť využitý pri kvantitatívnej analýze, ale mnoho farbív (napr. Orange G) sú necitlivé, zatiaľ čo iné (napr. Amidočern 10-B) má iné nevýhody. Tento prístup sa stal populárnym vďaka *Bradfordom* vyvinutej metóde, ktorá využíva farbivo Coomassie Brilliant Blue G 250 alebo R 250. Jeho viazanie do proteínu spôsobuje posun absorpčného maxima zo 465 nm (červená forma) na 595 nm (modrá forma). Farbivo sa pripravuje ako zásobný roztok rozpustením vo fosforečnej alebo chloristej (stabilnejší roztok) kyseline. Metóda popísaná v **tabuľke 1.6** je rýchla, jednoduchá jednoduková procedúra, pri ktorej je činidlo pridané ku vzorke a absorbancia je meraná pri 595 nm. Problémom danej metódy je tendencia komplexu proteín-farbivo viazať sa na povrch skla. Je preto vhodné používať jednorazové kvety, ale na druhej strane je relatívne

jednoduché odstrániť farbivo zo skla ponorením kvety do roztoku 0,1 M HCl alebo umytím koncentrovaným detergentom a následne vodou alebo acetónom.

Metóda je veľmi citlivá, pracuje v rozmedzí 0,2 – 1,4 mg proteínu/ml – štandardná metóda – a v rozmedzí 5 – 100 µg proteínu/ml v prípade *microassay* procedúry. Je veľmi závislá od primárnej štruktúry proteínov v dôsledku preferenčnej interakcie farbiva s bázickými (predovšetkým arginínovými) aminokyselinovými zvyškami. Výsledok môže byť ovplyvnený prítomnosťou detergentov, niektorými tlmivými roztokmi (napr. Tris) a polyolmi, podobne, avšak v menšom rozsahu, ako Lowryho metóda. Navyše, niektoré proteíny môžu byť relatívne nerozpustné v takom kyslom prostredí.

TABUĽKA 1.6 Bradfordova metóda – viazanie farbiva

1. Činidlá: intenzívnym miešaním rozpustíme 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 v 50 ml 95 % etanolu. Tento roztok sa zmieša so 100 ml 85 % w/v kyseliny fosforečnej, zriedi sa s vodou na 1 liter a prefiltruje sa. Činidlo je stabilné pri izbovej teplote po dobu minimálne 2 týždňov.
2. **Štandardná metóda:** pridaj 5 ml činidla do 0,1 ml vzorky s proteínom obsahujúcej 20 – 140 µg proteínu (0,2 – 1,4 mg proteínu/ml),
alebo
Microassay metóda: pridaj 0,2 ml činidla do 0,8 ml vzorky obsahujúcej 1 – 20 µg proteínu (5 – 100 µg proteínu/ml).
3. Zmiešaj a nechaj stáť po dobu 5 – 30 min.
4. Zmeraj absorbanciu pri 595 nm. Porovnávací roztok obsahuje 0,1 ml (0,8 ml v prípade *microassay*) tlmivého roztoku a 5 ml (0,2 ml pre *microassay*) činidla.



Farbenie striebrom

Metódy popísané doteraz sú dostatočné pre stanovenie koncentrácie proteínov pre väčšinu bežných purifikačných (čistiacich) metód. Avšak, v súčasnosti sú v centre záujmu proteíny, ktoré sprostredkujú procesy proliferácie a diferenciácie, ktoré sú aktívne pri koncentráciách 10^{-9} – 10^{-13} M. Izolácia takýchto proteínov je značne komplikovaná a proteíny sa získavajú iba vo veľmi malých koncentráciách (napríklad zo 150 litrov média je možné získať iba 2 – 10 µg interleukínu 3). Bežné metódy by spotrebovali značnú časť tohto proteínu. V súčasnosti bola preto vyvinutá vysoko-citlivá metóda, založená na schopnosti viazať striebro, schopnosť, ktorá sa už bežne efektívne využíva na citlivú detekciu proteínov separovaných polyakrylamidovou gélovou elektroforézou (**obrázok 1.5**, strana 27).

Touto metódou je možné určiť proteín v množstve 15 ng až 2 µg (150 ng až 20 µg proteínu/ml), čo reprezentuje približne 100-krát väčšiu citlivosť ako predchádzajúce metódy. Metóda je popísaná v **tabuľke 1.7**.

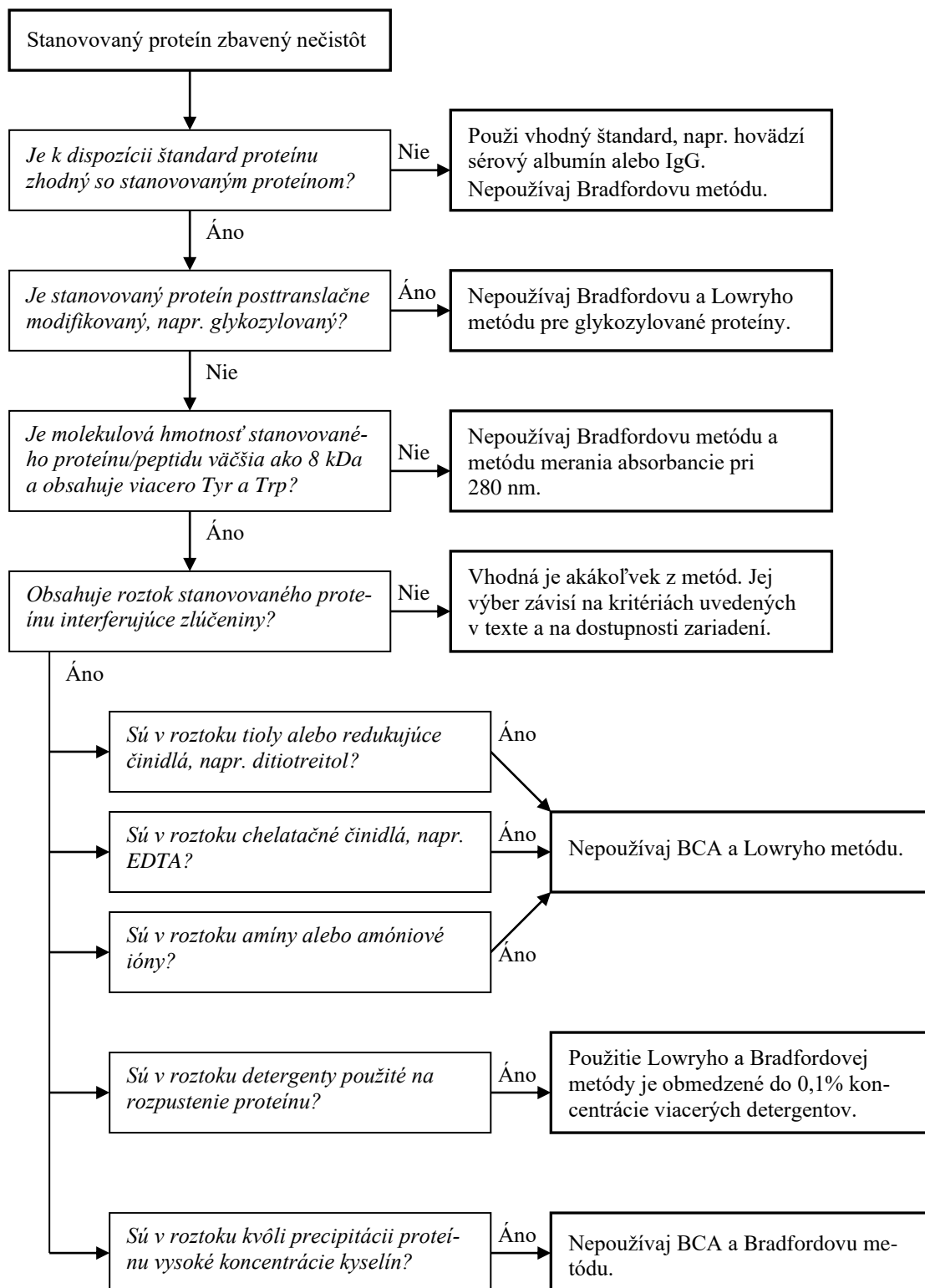
TABUĽKA 1.7 Farbenie striebrom

1. Zásobné roztoky činidiel: **A**, 7,5 % w/v Tween 20, 100 mM Tris, 100 mM Na₂CO₃. **B**, 2,5 % roztok glutaraldehydu denne čerstvo pripravený zo zásobného roztoku 25 % glutaraldehydu uchovávaného pri 4 °C. **C**, Amoniakálny roztok striebra denne čerstvo pripravený pridaním 20 % w/v NaOH a koncentrovaného NH₄OH (19 %) do 18,2 ml destilovanej vody, s následným pridaním po kvapkách 0,2 ml 20 % w/v dusičnanu strieborného. **D**, 3 % w/v tiosulfátu sodného denne čerstvo pripraveného.
 2. Pridaj 11 µl činidla A do 100 µl vzorky obsahujúcej proteín od 15 ng do 2 µg (150 ng až 20 µg proteínu/ml).
 3. Centrifuguj pri 450 g počas 5 minút cez 2-ml Bio-Gel P-2 kolónu pre-ekvilibrovanú v 10-krát zriedením činidla A.
 4. Pridaj 0,9 ml destilovanej vody ku vzorke na výsledný objem 1 ml.
 5. Pridaj 20 µl činidla B a zamiešaj vortexom 2 sekundy.
 6. Pridaj 200 µl činidla C a zamiešaj vortexom 2 sekundy.
 7. Nechaj stáť presne 10 minút pri izbovej teplote.
 8. Pridaj 40 µl činidla D.
 9. Zmeraj absorbanciu pri 420 nm. Porovnávací roztok obsahuje 100 µl použitého tlmivého roztoku opracovaného podľa bodov 2 až 8.
-

Farbenie striebrom vykazuje rozdielnu citlivosť na primárne zloženie proteínov obdobne ako v prípade Bradfordovej metódy. Vážnym problémom pri takejto *microassay* metóde je strata proteínu v dôsledku jeho adsorbcie na sklenených a plastových povrchoch. Táto adsorpcia môže byť minimalizovaná pridaním detergentu (Tween 20) ku vzorke pred jej opracovaním. Ďalším vážnym problémom je interferencia viacerých zložiek bežne prítomných vo vzorke a tlmivých roztokoch s danou metódou, vrátane aniónov (napr. Cl⁻), ktoré tvoria nerozpustné strieborné soli, EDTA, SDS v koncentráciách nad 0,01 % a redukčné činidlá ako ditiotritol a 2-merkaptotanol. Je preto zvyčajne potrebné nevyhnutne odstrániť akékoľvek potenciálne interferujúce reagenty zo vzorky gélovou filtráciou cez malú Bio-Gel P-2 kolónu. Treba poznamenať, že striebrom opracovaná vzorka ponechaná v kyvete niekoľko minút, spôsobí vytvorenie strieborného skla na stenách kyvety. To môže byť ľahko odstránené kyselinou dusičnou. Táto metóda je veľmi citlivá, ale mala by sa využívať iba v prípade nedostatku materiálu, keď nie je možné použiť alternatívne metódy.

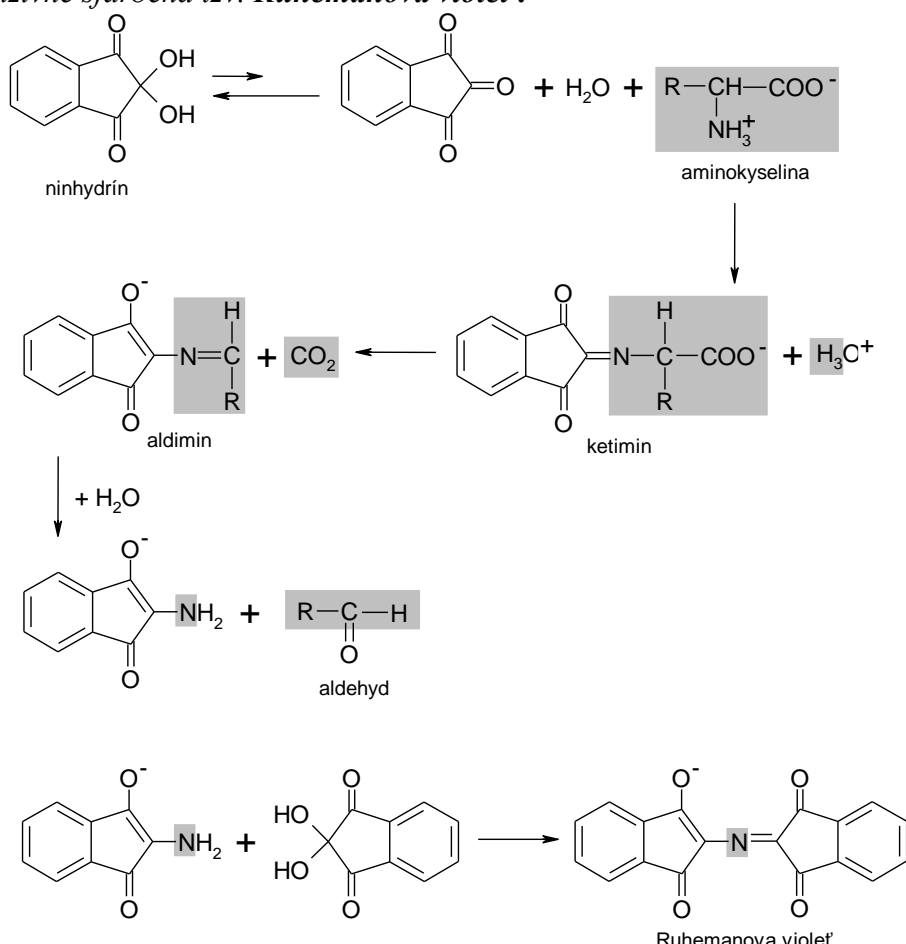
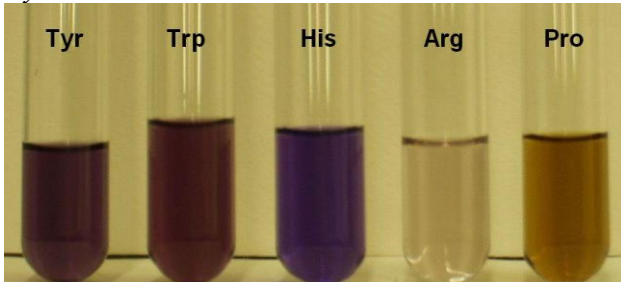
Vzhľadom na množstvo metód pre určovanie koncentrácie proteínov môže byť pri jej výbere nápomocná schéma uvedená na nasledujúcej strane.

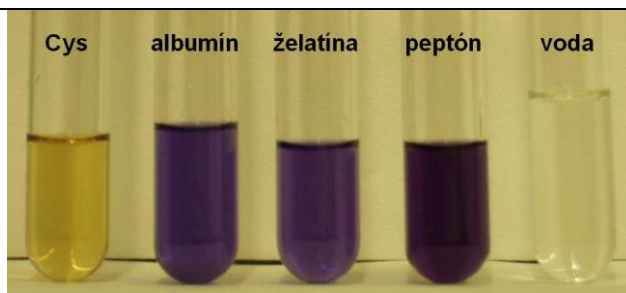
Schéma pre výber vhodnej metódy na zistenie koncentrácie proteínu (Noble a Bailey, 2009):



Použitá literatúra

- Creighton T. E.: Proteins structures and molecular properties, 2nd edition, W. H. Freeman and Company, New York 1993.
- Eaton D. C.: Laboratory investigations in organic chemistry, McGraw-Hill, Inc., New York 1989.
- Harris E. L. V., Angal S.: Protein purification methods, a practical approach, Oxford University Press, New York 1989.
- Hofmeister, F., 1888, Zur Lehre von der Wirkung der Salze. II. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 24, 247–260.
- Noble J. E., Bailey M. J. A., 2009, Quantitation of protein. Methods in Enzymology 463, 73–95.
- Pace N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T., 1995, How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. Protein Sci. 4, 2411–2423.
- Podhradský D., Mihalovová H.: Praktické cvičenia z biochémie, Košice 1989.
- Stryer L.: Biochemistry, 8th edition, W.H. Freeman and Company, New York 2015.

TÉMA	BIELKOVINY
Úloha 1:	Reakcie na dôkaz aminokyselín a bielkovín
	1. Ninhydrínová reakcia
Princíp:	<p>Reakcia, ktorá slúži na dôkaz $-NH_2$ (amino) skupín aminokyselín, peptidov a bielkovín. V prvej fáze reakcie sa vytvorí Schiffova báza (ketimin), ktorá sa potom oxidačne dekarboxyluje za vzniku aldiminu. Ten hydrolyzuje na nestálu formu amínu, ktorá reaguje s ďalšou molekulou ninhydrínu a vzniká (zvyčajne) intenzívne sfarbená tzv. Ruhemanova violet':</p>  <p>* šedou farbou sú zvýraznené tie atómy a molekuly, ktoré pochádzajú z pôvodnej aminokyseliny.</p> <p>Prehľad farebných produktov v závislosti od použitej aminokyseliny a bielkoviny je znázornený na obrázku 1.6.</p> 

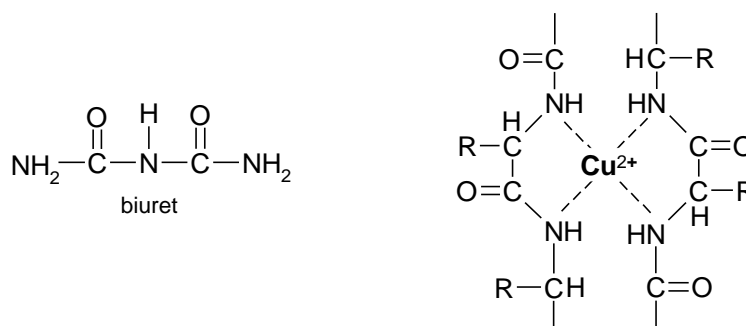


Obrázok 1.6 Ninhydrínová reakcia (nešpecifická reakcia na aminokyseliny, peptidy a bielkoviny)

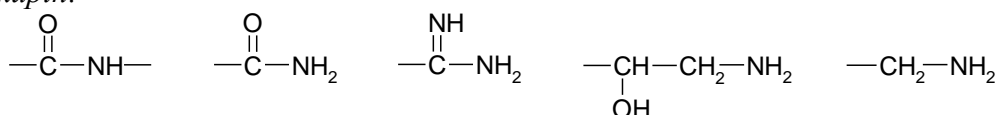
2. Biuretova reakcia

Princíp:

Biuretova reakcia je všeobecný test na dôkaz peptidov a bielkovín, teda látok obsahujúcich peptidové väzby ($-\text{CO}-\text{NH}-$). Je pomenovaná podľa zlúčeniny biuret, ktorá dáva rovnaké fialové sfarbenie ako bielkoviny a peptidy. Fialová farba je dôsledkom vzniku komplexnej zlúčeniny medzi mednatými iónmi a amidovými skupinami v peptidoch a bielkovinách:

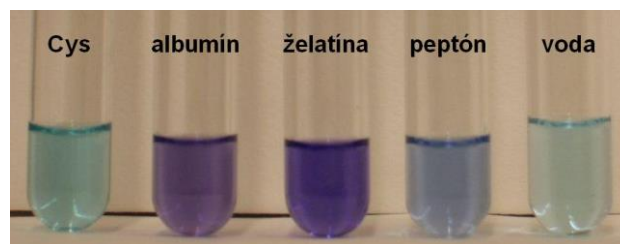


Podobné sfarbenie dávajú aj zlúčeniny, ktoré obsahujú dve alebo viac z týchto skupín:



Z toho je zrejmé, že aj roztoky aminokyselín obsahujúcich niektorú z uvedených skupín môžu dávať pozitívnu reakciu.

Farebné produkty v závislosti od skúmanej látky sú znázornené na **obrázku 1.7**, kde pozitívnu reakciu dávajú albumín, želatína a peptón (reakcia s Cys a vodou je negatívna).

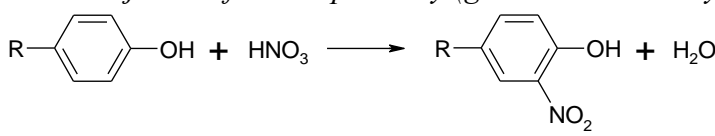
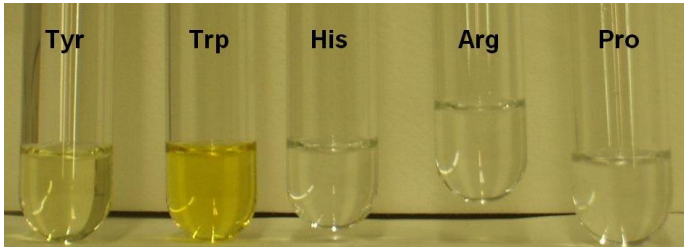
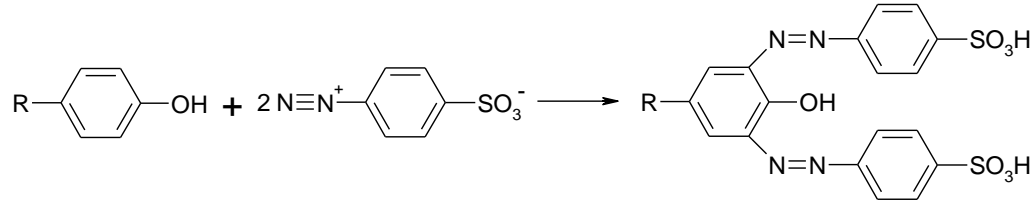
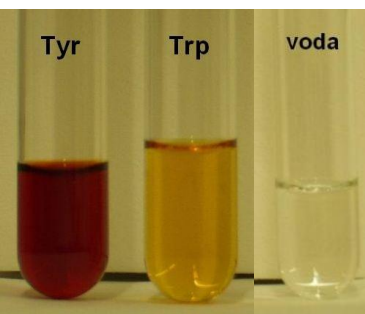
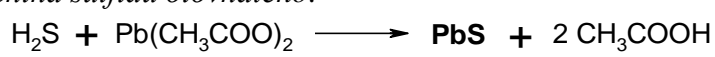
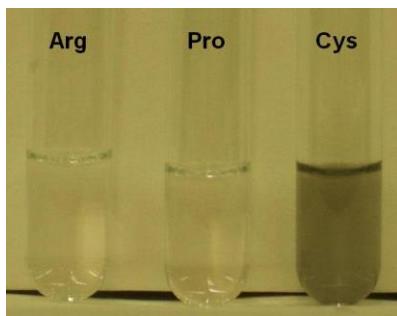


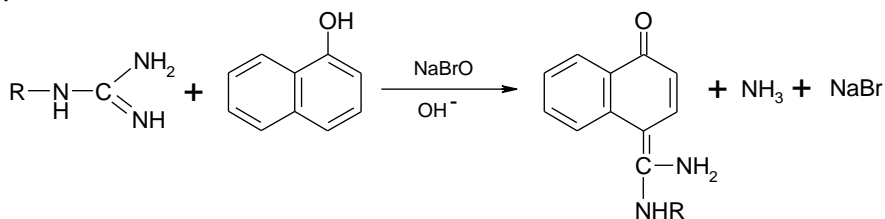
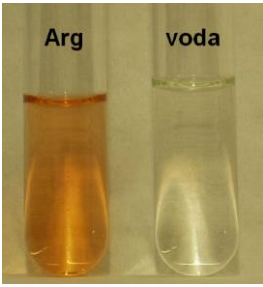
Obrázok 1.7 Biuretova reakcia

3. Precipitačné reakcie bielkovín

Princíp:

Bielkoviny môžu precipitovať (zrážať sa) účinkom **tepla, alkoholu, anorganických kyselín alebo solí ťažkých kovov**. Pri tomto procese prechádzajú z tzv. natívneho stavu (funkčná forma bielkoviny s charakteristickou sekundárnou a terciárnou štruktúrou) do denaturovaného stavu, kedy dochádza k porušeniu nekovalentných interakcií, ktoré stabilizujú sekundárnu a terciárnu štruktúru bielkoviny. V mnohých prípadoch takéto denaturované bielkoviny v dôsledku

	zmeny rozpustnosti precipitujú.
	4. Xanthoproteínová reakcia
Princíp:	<p>Nitráciou aromatických aminokyselín (Phe, Tyr, Trp) koncentrovanou kyselinou dusičnou vznikajú žlté sfarbené produkty (gréč. xanthos = žltý).</p> $\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} + \text{HNO}_3 \longrightarrow \text{R}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})(\text{NO}_2) + \text{H}_2\text{O}$   <p>Obrázok 1.8 Xanthoproteínová reakcia</p>
	5. Ehrlichova reakcia
Princíp:	<p>Látky s imidazolovou alebo fenolovou skupinou (His, Tyr, histamín, tyramín, adrenalín) sa vyznačujú kopuláciou s diazotovanou kyselinou sulfanilovou za vzniku červeného diazofarbiva:</p> $\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} + 2 \text{N} \equiv \text{N}^+ - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{SO}_3^- \longrightarrow \text{R}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})(\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{H})_2$   <p>Obrázok 1.9 Ehrlichova reakcia</p>
	6. S–Pb reakcia
Princíp:	<p>Cys a bielkoviny obsahujúce Cys uvoľňujú pôsobením hydroxidov za tepla sírovodík, ktorý možno dokázať reakciou s octanom olovnatým, pričom vzniká čierna zrazenina sulfidu olovnateho:</p> $\text{H}_2\text{S} + \text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \longrightarrow \text{PbS} + 2 \text{CH}_3\text{COOH}$   <p>Obrázok 1.10 S–Pb reakcia</p>

7. Sakaguchiho reakcia	
Princíp:	<p><i>Guanidínové deriváty (Arg, metylguanidín, agmatín) sa oxidujú brómnanom sodným v prítomnosti α-naftolu za vzniku ružovo príp. červeno sfarbeného produktu:</i></p> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: center;">Obrázok 1.11 Sakaguchiho reakcia</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. 0,1 % roztoky aminokyselín Arg, Cys, Pro, Trp, Tyr 2. 1 % roztok ľudského albumínu 3. 1 % roztok želatíny (tepelne upravená forma kolagénu) 4. 1 % ninhydrínové činidlo (2 g ninhydrínu rozpustíme v 20 ml 96 % etanolu a doplníme destilovanou vodou na objem 200 ml) 5. biuretové činidlo (9 g vínanu sodnodraselného rozpustíme v 40 ml 0,2 M roztoku hydroxidu sodného, pridáme 1 g CuSO₄ a 1 g KI. Roztok doplníme roztokom hydroxidu sodného na objem 200 ml.) 6. koncentrovaná kyselina dusičná 7. 0,5 % roztok kyseliny sulfanilovej v 2 % kyseline chlorovodíkovej 8. 0,5 % roztok dusitanu sodného 9. 10 % roztok hydroxidu sodného 10. 5 % roztok octanu olovnatého 11. brómová voda 12. 0,02 % etanolový roztok α-naftolu
Materiál:	sada hrubostenných skúmaviek, stojan na skúmavky, mikropipety, vodný kúpeľ (hrniec s vodou), varič, laboratórna trepačka
Postup:	<p>Každá z ôsmich očíslovaných skúmaviek v stojane obsahuje zásobný roztok jednej z nasledujúcich látok: Arg, Cys, Pro, Trp, Tyr, albumín, želatína a destilovaná voda.</p> <p>Do prvých ôsmich prázdnych skúmaviek (nezabudneme si ich očíslovať) napipetujeme po 2 ml z uvedených zásobných roztokov. Do každého z nich pridáme 0,5 ml ninhydrínového činidla. Roztoky v skúmavkách premiešame (opatrným pretrepaním pomocou laboratórnej trepačky) a ponoríme na 5 – 10 min do horúceho vodného kúpeľa. Po vybratí a vychladnutí skúmaviek zaznamenáme jednotlivé zafarbenia roztokov. Výsledkom ninhydrínovej reakcie je vznik farebného produktu, a to v širokom rozmedzí farieb od žltej cez hnedú až po fialovú v závislosti od skúmanej látky. Ninhydrínová reakcia je negatívna pre vodu, ktorú možno týmto spôsobom odlišit' od ostatných roztokov.</p> <p>Do ďalších ôsmich skúmaviek znova napipetujeme po 1 ml zo zásobných roztokov skúmaných látok. Do každej z nich pridáme 1 ml biuretového činidla,</p>

	<p>premiešame a zaznamenáme zafarbenia roztokov. Biuretovou reakciou odlišíme roztok albumínu a želatíny od roztokov aminokyselín.</p> <p>Na jednoznačné odlišenie albumínu (bielkovina s natívnou štruktúrou) od želatíny (hydrolyzovaná bielkovina kolagén) využijeme test na precipitáciu bielkoviny účinkom vysokej teploty. Do dvoch skúmaviek napipetujeme po 1 ml zo zásobných roztokov, ktoré boli pozitívne na biuretovú reakciu a ponoríme na 5 – 10 min do horúceho vodného kúpeľa. V roztoku s albumínom pozorujeme bielu zrazeninu. Roztok želatíny zostáva číry.</p> <p>Do ďalších piatich skúmaviek napipetujeme po 2 ml z roztokov, ktoré zatiaľ neboli priradené. Do každého z nich pridáme 0,5 ml koncentrovanej HNO₃, zamiešame a zaznamenáme farebné zmeny. V prípade, že nedochádza k žiadnej farebnej zmene, ponoríme skúmavky na 2 – 4 min do vodného kúpeľa. Pozitívnu xanthoproteínovú reakciu dávajú aminokyseliny Tyr a Trp.</p> <p>Ich dôkaz nám potvrdí Ehrlichova reakcia. Do dvoch skúmaviek napipetujeme po 1 ml zo zásobných roztokov, ktoré boli pozitívne na xanthoproteínovú reakciu. Do osobitnej skúmavky napipetujeme 2 ml 0,5 % kyseliny sulfanilovej a 2 ml 0,5 % dusitanu sodného. Roztok dobre premiešame a odpipetujeme po 1 ml do pripravených dvoch skúmaviek s aminokyselinami. Obe skúmavky premiešame a pridáme po 1 ml 10 % NaOH. V skúmavke s Tyr pozorujeme vznik červeno sfarbeného produktu. Roztok s Trp sa sfarbí na žlté až oranžovo. Ak ani v jednej zo skúmaviek nevzniká červené sfarbenie, pridáme do oboch ešte po 1 ml 10 % NaOH.</p> <p>Na dôkaz Cys využijeme S–Pb reakciu. Do troch skúmaviek napipetujeme po 1 ml zo zásobných roztokov, ktoré zatiaľ neboli určené. Do každej z nich pridáme po 2 ml 10 % NaOH a 2 – 4 kvapky 5 % octanu olovnatého. Premiešame a ponoríme na 5 – 10 min do horúceho vodného kúpeľa. Pozorujeme vznik sivého produktu v jednom z roztokov, čo dokazuje prítomnosť Cys.</p> <p>Na rozlíšenie Arg od Pro využijeme Sakaguchiho reakciu. Do dvoch skúmaviek odpipetujeme po 2 ml z posledných dvoch neurčených zásobných roztokov a pridáme k nim po 0,5 ml 10 % NaOH, 4 – 6 kvapiek α-naftolu a 2 – 4 kvapky brómovej vody. Roztok s Arg sa sfarbí na ružovo.</p>
Pozorovanie:	Zaznamenáme zafarbenia roztokov v závislosti od použitej reakcie.
Záver:	Ku každej očíslovanej skúmavke s príslušným roztokom priradíme aminokyselinu, resp. bielkovinu.

TÉMA	BIELKOVINY
Úloha 2:	<i>Izolácia kazeínu z mlieka</i>
Princíp:	<i>Kazeín je hlavnou bielkovinovou zložkou mlieka (tvorí až 80 % mliečnych proteínov), kde sa nachádza vo forme vápenatej soli. Patrí do skupiny fosfoproteínov a vyznačuje sa veľmi nízkym zastúpením prvkov sekundárnej štruktúry. V mlieku vytvára suspenziu častíc (tzv. kazeínové micely), v ktorých sú jednotlivé makromolekuly kazeínu stabilizované hydrofóbnymi interakciami a iónmi vápnika. Okyslením silnou kyselinou (napr. HCl) na hodnotu svojho izoelektrického bodu (pI 4,6) dochádza k destabilizácii kazeínových miciel, výsledkom čoho je precipitácia kazeínu.</i>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. mlieko 2. 10 % roztok kyseliny chlorovodíkovej 3. 96 % etanol (denaturovaný)
Materiál:	centrifúga, centrifugačné skúmavky, gáza alebo obväz, sklenená tyčinka, mikropipety, kadička s objemom 100 ml
Postup:	50 ml mlieka centrifugujeme 10 minút pri 3000 otáčkach za minútu (ot/min), čo pri nami použitom rotore odpovedá 1000 g (RCF = <i>relative centrifugal force</i>). Vylúčený tuk odstránime prefiltrovaním mlieka cez kúsok gázy do kadičky s objemom 100 ml. Následne k mlieku pridávame 10 % HCl, a to po kvapkách za stáleho miešania sklenenou tyčinkou do vytvorenia vločkovitej zrazeniny (spotreba je približne 1 ml HCl, ak použijeme nadbytok HCl, zrazenina sa začne znova rozpúšťať). Suspenziu prelejeme do centrifugačnej skúmavky a odstreďujeme 10 minút pri 3000 ot/min (1000 g). Supernatant (roztok nad zrazeninou) zlejeme, zrazeninu premyjeme priamo v centrifugačnej skúmavke destilovanou vodou (25 ml) a opäť odstreďujeme. Vodu zlejeme, zrazeninu kazeínu rozmiešame s 25 ml 96 % etanolu, väčšie kúsky rozdrobíme a znova centrifugujeme. Po odstredení zlejeme etanol a kazeín necháme voľne schnúť na filtračnom papieri. Na ďalšom cvičení kazeín odvážime a jeho hmotnosť zapíšeme do protokolu.
Záver:	Uvedieme množstvo vyizolovaného kazeínu (v gramoch na 50 ml mlieka).
Úloha 3:	<i>Stanovenie koncentrácie bielkoviny Lowryho metódou</i>
Princíp:	<i>Lowryho metóda je jeden z najčastejšie využívaných spôsobov stanovenia koncentrácie bielkovín. V prvom kroku bielkovina reaguje s meďnatými iónmi v alkalickej prostredí, pričom dochádza k ich redukcii na meďné ióny. Následne dochádza účinkom meďných iónov k redukcii kyseliny fosfomolybdeno-fosfovolfrámovej, ktorá je súčasťou Folinovho činidla. Finálny produkt tejto reakcie má modré sfarbenie. Jeho intenzita závisí od koncentrácie bielkoviny v roztoku. Množstvo bielkoviny vo vzorke sa určí na základe hodnoty nameranej absorpcie pri 750 nm.</i>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. roztok A: 2 % uhličitan sodný v 0,1 M hydroxide sodnom 2. roztok B: 0,5 % pentahydrát síranu meďnatého v 1 % tetrahydráte vínanu sodnodraselného (roztoky A, B zmiešame max. 4 hod. pred cvičením v pomere 50:1) 3. Folinovo činidlo (kyselina fosfomolybdeno-fosfovolfrámová) 4. štandardný roztok bielkoviny (hovädzí albumín) s koncentráciou 50 mg/100 ml 5. vzorka bielkoviny s neznámou koncentráciou

Materiál:	sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nastavcom, absorpčný spektrofotometer, plastové kyvety, laboratórna trepačka						
Postup:	Do šiestich označených skúmaviek pipetujeme sklenenými pipetami štandardný roztok hovädzieho albumínu podľa tabuľky 1.8 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených. Do siedmej skúmavky pipetujeme namiesto štandardu 1 ml roztoku bielkoviny s neznámou koncentráciou (do zošita nezabudneme zapísať číslo vzorky).						
TABUĽKA 1.8	0	1	2	3	4	5	vzorka
štandard albumínu [ml]	–	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	–
neznáma vzorka [ml]	–	–	–	–	–	–	1
destilovaná H ₂ O [ml]	1	0,95	0,90	0,75	0,50	0,25	–
A + B (50:1) [ml]	5	5	5	5	5	5	5
	premiešať nechať 10 min reagovať						
Folinovo činidlo [ml]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	premiešať nechať 30 min reagovať určiť absorbanciu pri 750 nm						
množstvo bielkoviny v skúmavke [mg]	0	0,025	0,050	0,125	0,250	0,375	x
absorbancia pri 750 nm	–						
Vyhodnotenie:	Pomocou kalibračných roztokov (skúmavky 1 až 5) zostrojíme kalibračný graf (závislosť absorbancie štandardného roztoku hovädzieho albumínu pri 750 nm od jeho množstva v roztoku). Na tento účel je vhodný bežne dostupný program MS Excel. Body na grafe preložíme priamkou v tvare $y = ax$, kde x predstavuje množstvo bielkoviny v skúmavke, y je nameraná hodnota absorbancie pri 750 nm a člen a je konštanta. Množstvo bielkoviny x (v mg na 1 ml vzorky) vypočítame dosadením hodnoty absorbancie vzorky za y v uvedenej rovnici. Zistené množstvo porovnáme so skutočnou hodnotou a vypočítame relatívnu chybu (v %).						
Záver:	Uvedieme koncentráciu bielkoviny vo vzorke (v mg/ml) spolu s relatívnou chybou.						

TÉMA	BIELKOVINY						
Úloha 4:	Stanovenie izoelektrického bodu ľudského albumínu						
Princíp:	Jedným z možných spôsobov stanovenia izoelektrického bodu bielkovín (pI) je zistiť hodnotu pH, pri ktorej je bielkovina najmenej rozpustná vo vode. Pri tomto pH sa celkový náboj bielkoviny rovná nule a ľahko sa vyzráža, čo sa prejaví zvýšením turbidity (zakalenia) roztoku. Vyzrážanie bielkoviny sa urýchli pridaním vhodných dehydratačných prostriedkov, napr. etanolu alebo acetónu. Vzniknutý zákal je možné kvantifikovať meraním optickej hustoty roztoku pri určitej vlnovej dĺžke. Čím viac je roztok zakalený, tým vyššia je hodnota optickej hustoty. Dôvodom je rozptyl žiarenia na vyzrážaných bielkovinových časticiach.						
Reagencie:	1. 0,1 M octan sodný 2. 0,4 % roztok ľudského albumínu (0,4 g ľudského albumínu rozpustíme za tepla v 10 ml 0,1 M CH ₃ COONa a doplníme na objem 100 ml destilovanou vodou) 3. 0,1 M kyselina octová 4. 1 M kyselina octová 5. 96 % etanol						
Materiál:	sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nastavcom, absorpčný spektrofotometer, plastové kyvety, laboratórna trepačka						
Postup:	Do série šiestich skúmaviek pipetujeme roztoky podľa nasledujúcej tabuľky:						
TABUĽKA 1.9		1	2	3	4	5	6
0,1 M CH ₃ COONa	[ml]	1	1	1	1	1	1
0,1 M CH ₃ COOH	[ml]	0,12	0,25	0,5	1	2	–
destilovaná H ₂ O	[ml]	1,88	1,75	1,5	1	–	1,6
1 M CH ₃ COOH	[ml]	–	–	–	–	–	0,4
premiešať							
0,4 % albumín	[ml]	1	1	1	1	1	1
etanol	[ml]	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
premiešať nechať 10 min stáť určiť optickú hustotu pri 540 nm referenčná kyveta obsahuje destilovanú vodu							
pH		5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1
optická hustota pri 540 nm							
	Za izoelektrický bod albumínu sa považuje pH hodnota, pri ktorej má roztok najvyššiu hodnotu optickej hustoty.						
Vyhodnotenie:	Zostrojíme závislosť optickej hustoty pri 540 nm od pH. Body na grafe preložíme polynómom druhého, príp. tretieho stupňa.						
Záver:	Uvedieme nami zistenú hodnotu izoelektrického bodu ľudského albumínu.						

TÉMA	BIELKOVINY
Úloha 5:	Frakcionácia bielkovín vaječného bielka
Princíp:	<p>Jednou z najčastejšie používaných metód na frakcionáciu zmesi bielkovín je ich postupné zrážanie zvyšovaním iónovej sily roztoku pridávaním neutrálnych anorganických solí pri vhodnom pH. Tento postup je výhodný najmä pre veľké objemy a bielkoviny sa nenedenaturujú pri vysokých koncentráciách solí. Získaná zrazenina bielkoviny však obsahuje vysoké percento soli, ktorá sa musí odstraňovať zdlhovou dialýzou. Na zrážanie (vysol'ovanie) bielkovín sa takmer výlučne používa dobre rozpustný síran amónny. Iné soli (chlorid sodný, síran sodný, fosfáty, atď.) sa používajú len v zvláštnych prípadoch. Koncentrácia síranu amónneho sa vyjadruje stupňom nasýtenia (saturácia) roztoku; nasýtený roztok má stupeň sýtenia 1. Vyjadrovanie saturácie v percentách môže viesť k zámene s hmotnostným zlomkom (w), ktoré vyjadruje množstvo látky v gramoch na 100 g roztoku.</p> <p>Koncentrácia síranu amónneho sa zvyšuje pridaním buď nasýteného roztoku, alebo pevnej soli. Prvý spôsob je jednoduchší a zaručuje rovnomernejšie zvyšovanie koncentrácie, ale dá sa použiť len pre nižšie stupne nasýtenia. Druhý spôsob dovoľuje dosiahnuť vyššie stupne nasýtenia. Soľ je potrebné pridávať po malých množstvách a vyčekať, až sa rozpustí, aby sa roztok sýtil rovnomerne. Po pridaní celého vyrátaného množstva síranu amónneho necháme roztok vždy určitú dobu postáť, aby zrážanie prebehlo kvantitatívne. Len potom zrazeninu odcentrifugujeme alebo odfiltrujeme. Jednoduchým príkladom popísanej metódy je frakcionácia ovoglobulínov a ovoalbumínu vaječného bielka. Nasýtením roztoku bielka do stupňa 0,5 sa vyzráža globulínová frakcia, albumín ostáva v roztoku. Albumín sa vyzráža nasýtením filtrátu do stupňa 0,9.</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> vaječný bielok nasýtený roztok síranu amónneho (536,34 g síranu na 1000 ml roztoku pri 20 °C, čo predstavuje 4,06 M roztok) kryštalický síran amónny koncentrovaná kyselina octová
Materiál:	univerzálne indikátorové papieriky pre pH 0 – 12, kadička s objemom 100 ml, odmerný valec s objemom 50 ml, pinzeta, lyžička, sklenená tyčinka, centrifugačné skúmavky, centrifúga, gáza
Postup:	<p>Bielko oddelíme od žĺtka a pinzetou z neho odstránime hrubé častice. Odmerným valcom odmeriame 25 ml bielka a prelejeme do kadičky. Po malých dávkach a za neustáleho miešania k nemu pridávame rovnaký objem (25 ml) nasýteného roztoku síranu amónneho a miešame ďalších 5 minút. Roztok so zrazeninou (ovoglobulíny) prelejeme do centrifugačnej skúmavky a centrifugujeme 10 minút pri 3000 ot/min (1000 g). Supernatant obsahujúci ovoalbumín prelejeme cez gázu do odmerného valca a stanovíme jeho objem. Zrazeninu ovoglobulínov odstránime.</p> <p>Pokračujeme tým, že upravíme pH supernatantu (ovoalbumín) koncentrovanou kyselinou octovou na hodnotu približne 5 (4 – 6 kvapiek kyseliny na 40 – 45 ml supernatantu). Potom do tohto roztoku pridáme za stáleho miešania vypočítané a navážené množstvo kryštalického síranu amónneho (30 g síranu na 100 ml supernatantu). Po jeho úplnom rozpustení necháme suspenziu stáť najmenej 30 minút. Vytvorenú zrazeninu ovoalbumínu centrifugujeme 10 minút pri 6000 ot/min (4000 g). Supernatant zlejeme a zrazeninu rozpustíme v 30 ml</p>

	destilovanej vody. Odmeriame celkový objem tohto roztoku a hodnotu zapíšeme do zošita. V prípade potreby roztok prefiltrujeme a maximálne 15 ml z neho prelejeme do dialyzačnej trubice s membránou, ktorú ponoríme do kadičky s objemom 600 ml obsahujúcej destilovanú vodu (viď úloha 6).
Úloha 6:	Dialýza bielkovín
Princíp:	<i>Dialýza patrí k najjednoduchším biochemickým metódam separácie látok na základe rôznej veľkosti ich molekúl. Využíva difúziu nízkomolekulových látok cez polopriepustnú membránu (nepriepustnú pre veľké molekuly) z roztoku s vyššou koncentráciou do roztoku s nižšou koncentráciou. Molekuly bielkovín, ktorých častice majú rozmery od niekoľko nanometrov do 200 nm, majú v roztoku niektoré vlastnosti koloidov, t.j. ich častice neprechádzajú pre svoju veľkosť otvormi dialyzačných membrán. Dialýza umožňuje v biochémii napr. jednoduché oddelenie solí od roztoku bielkovín (pri vysolovaní bielkovín síranom amónnym). Najčastejšie sa využíva tam, kde chceme vysokomolekulové látky zbaviť nízkomolekulových nečistôt. V minulosti sa k príprave membrán využívali koloidum, celofán alebo membrány zvieracieho pôvodu (črevá, vaječná blanka, mechúry). V súčasnej dobe sú komerčne dostupné umelé membrány v tvare dlhej trubice rôzneho priemeru a s vhodnou veľkosťou pórov.</i>
Reagencie:	1. 1 M dusičnan bárnatý 2. roztok ovoalbumínu z úlohy 5
Materiál:	dialyzačná trubica s membránou, kadička s objemom 600 ml, magnetické miešadlo, stojan
Postup:	15 ml roztoku ovoalbumínu z úlohy 5 prenesieme do dialyzačnej trubice, ktorú upevníme k laboratórnemu stojanu a ponoríme do kadičky s destilovanou vodou. Rýchlosť dialýzy závisí od koncentračného spádu (na začiatku je najrýchlejšia, postupne sa spomaľuje), počtu a veľkosti pórov v membráne, hrúbky membrány, elektrických vzťahov medzi membránou a difundujúcimi časticami, ďalej od veľkosti plochy membrány a objemu roztoku, od teploty. Počas dialýzy vodu v kadičke miešame pomocou magnetického miešadla, čím dialýzu urýchľujeme. Priebeh dialýzy môžeme sledovať zrážaním síranových aniónov dusičnanom bárnatým vo vode: $\text{SO}_4^{2-} + \text{Ba}^{2+} \rightarrow \text{BaSO}_4(\text{s})$ Asi po hodinovej dialýze roztok použijeme na stanovenie koncentrácie bielkovín biuretovou metódou (viď úloha 7).
Úloha 7:	Stanovenie koncentrácie bielkovín biuretovou metódou
Princíp:	<i>Biuretovu reakciu dávajú peptidy a bielkoviny v dôsledku prítomnosti peptidových väzieb (–CO–NH–). Je pomenovaná podľa zlúčeniny biuret, ktorá dáva rovnaké fialové sfarbenie ako bielkoviny a peptidy. Reakcia je založená na tvorbe tetraamóniovej soli s komplexne viazanou meďou. Metóda je rýchla a spoľahlivá. Výsledky pre jednoduché roztoky bielkovín sú v dobrej zhode s výsledkami iných metód. V prípade skúmania vzoriek s vyšším obsahom lipidov sú namerané hodnoty o niečo vyššie ako hodnoty zodpovedajúce skutočnému stavu. V tom prípade sa odporúča vzorku prečistiť napr. vyzrážaním.</i>
Reagencie:	1. biuretové činidlo 2. štandardný roztok sérovej bielkoviny (ľudský albumín) s koncentráciou 1 g/100 ml 3. dialyzovaná vzorka vaječnej bielkoviny
Materiál:	sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nadstavcom, absorpčný

	spektrofotometer, plastové kyvety, laboratórna trepačka						
Postup:	Do šiestich označených skúmaviek pipetujeme sklenenými pipetami štandardný roztok ľudského albumínu podľa tabuľky 1.10 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených. Do siedmej skúmavky pipetujeme namiesto štandardu 1 ml roztoku dialyzovanej bielkoviny z úlohy 6 . V prípade vysokej hodnoty absorpcie môžeme vzorku primerane riediť.						
TABUĽKA 1.10	0	1	2	3	4	5	vzorka
štandard albumínu [ml]	–	0,2	0,6	1	1,5	2	–
dialyzovaná vzorka [ml]	–	–	–	–	–	–	1
destilovaná H ₂ O [ml]	2	1,8	1,4	1	0,5	–	1
biuretové činidlo [ml]	4	4	4	4	4	4	4
	premiešať nechať 20 min reagovať určiť absorpciu pri 540 nm						
množstvo bielkoviny v skúmavke [mg]	0	2	6	10	15	20	x
absorbancia pri 540 nm	–						
Vyhodnotenie:	Pomocou kalibračných roztokov (skúmavky 1 až 5) zostrojíme kalibračný graf (závislosť absorpcie štandardného roztoku ľudského albumínu pri 540 nm od množstva) a z neho určíme množstvo ovoalbumínu v mg na 1 ml dialyzovanej vzorky (x) . Vypočítame celkové množstvo ovoalbumínu (v mg) vo vaječnom bielku (vynásobením hodnoty odčítanej z grafu objemom roztoku ovoalbumínu po pridaní destilovanej vody na rozpustenie zrazeniny pred dialýzou). Túto hodnotu vydáme objemom použitého bielka (25 ml), čím získame koncentráciu ovoalbumínu v bielku (v mg/ml).						
Záver:	Uvedieme koncentráciu ovoalbumínu vo vaječnom bielku (v mg/ml).						

TÉMA	BIELKOVINY
Úloha 8:	Kvalitatívna analýza aminokyselín papierovou chromatografiou
Princíp:	<i>Chromatografia patrí medzi separačné postupy, kde sa na delenie používa systém dvoch fáz – stacionárna a mobilná. Mobilnou fázou sa zložky delenej zmesi postupne vymývajú (eluujujú) zo stacionárnej fázy na základe svojich schopností rozdeliť sa medzi zložky použitej sústavy.</i>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. štandardné 0,1 % roztoky aminokyselín (Arg, Asp, Cys, Leu, Lys, Pro, Trp, Tyr) 2. zmes 1-butanolu, kyseliny octovej a vody v pomere 60:15:25 (mobilná fáza) 3. 1 % roztok ninhydrínu v rozprašovači 4. neznáma vzorka (zmes troch aminokyselín)
Materiál:	filtračný papier, automatické pipety, sušič na vlasy, ceruzka, pravítko, termostat, kadička s objemom 600 ml (vysoká), vrchnák (Petriho miska, príp. dostatočne široká kadička)
Postup:	<p>Na filtračný papier (16 × 14 cm) si 2 cm od jej spodného okraja ceruzkou (nie perom) nakreslíme štartovaciu čiaru. Na ňu zakreslíme deväť bodov rovnomerne od seba (vzdialenosť medzi bodmi 1,5 cm). Na prvých osem z nich nanesieme po 5 µl štandardných roztokov aminokyselín (Arg, Asp, Cys, Leu, Lys, Pro, Trp, Tyr). Deviaty bod je určený pre 5 µl vzorky (do zošita nezabudneme zapísať číslo vzorky). Roztoky nanášame opatrne automatickou pipetou. Pri nanášaní škvŕnu sušíme sušičom na vlasy. Pozíciu tej-ktorej aminokyseliny, resp. vzorky zaznamenáme ceruzkou priamo na papieri pod príslušnou škvŕnou. Papier s nanesenými roztokmi stočíme do valca tak, aby sa okraje neprekrývali. Okraje zaistíme zošívачkou a papier vložíme do kadičky (objem 600 ml), ktorá obsahuje mobilnú fázu, prikryjeme vrchnákom a necháme vyvíjať vzostupne (30 – 40 min). Pozor, hladina mobilnej fázy nesmie byť vyššie ako 1 cm nad spodným okrajom platne. V opačnom prípade by došlo k vyplaveniu aminokyselín do mobilnej fázy. Keď je čelo mobilnej fázy 1 až 2 cm pod horným okrajom, papier (chromatogram) vyberieme, ceruzkou označíme čelo mobilnej fázy a chromatogram vysušíme. Detekciu aminokyselín vykonáme tak, že chromatogram rovnomerne postriekame roztokom ninhydrínu a vložíme na 5 – 10 min do termostatu na 90 °C. Nakoniec ceruzkou označíme stredy všetkých viditeľných škvŕn.</p>
Vyhodnotenie:	<p>Určíme hodnoty R_f (retenčný faktor) pre jednotlivé štandardy ako aj pre zložky neznámej vzorky a porovnáme ich navzájom. R_f hodnoty vypočítame ako podiel vzdialenosti stredy škvŕny od štartu (A) a vzdialenosti čela mobilnej fázy od štartu (B): $R_f = A/B$. R_f je funkciou adsorpčnej schopnosti stacionárnej fázy a pre danú látku závisí od systému, v ktorom je meraný, t.j. od teploty, druhu adsorbentu a od zloženia mobilnej fázy.</p>
Záver:	<p>Uvedieme, ktoré tri aminokyseliny obsahovala naša vzorka. K protokolu priložíme aj chromatogram, príp. ho môžeme prekresliť do vyhodnotenia.</p>

2 LIPIDY

Lipidy (z gréckeho *lipos* = tuk) predstavujú pestrú skupinu látok nerozpustných vo vode, ale dobre sa rozpúšťajúcich v nepolárnych rozpúšťadlách (chloroform, éter, benzén). Z hľadiska zložitosti ich rozdeľujeme na:

- **jednoduché**, kam patria *acylglyceroly* (tuky a oleje) a *vosky*,
- **zložené**, kam zaraďujeme polárne lipidy *fosfoacylglyceroly* (fosfatidáty) a *sfolingolipidy*, ako aj *lipoproteíny* (lipid + proteín alebo peptid) a *glykolipidy* (lipid + sacharid).

Lipidy plnia v organizmoch viaceré funkcie, z ktorých najdôležitejšie sú:

1. Zdroj a rezerva energie. V závislosti od človeka, 20 až 60 % všetkých kalórií (Joulov) pochádza z konzumácie tukov a olejov. Tuky a oleje sú najkoncentrovanejšou formou energie v potravinách – produkujú 35 000 – 40 000 Joulov (8 000 – 9 000 kalórií) energie na gram, čo je viac ako dvojnásobok energie obsiahnutej v 1 grame sacharidov a bielkovín (~ 15 000 Joulov, t.j. 3 700 kalórií). Redukcia príjmu tukov a olejov v strave je preto veľmi efektívnym spôsobom, ako schudnúť. Tuky a oleje robia jedlo chutnejším a sú dôležité v strave kvôli ich pomalému tráveniu. Pomalé štiepenie tukov zabraňuje pocitom hladu počas dlhšej doby, ako po požití stravy bez tukov. Trávenie neprebíha v žalúdku, ale v tenkom čreve. Nadbytočné množstvo jedla v stravovaní sa premieňa v tele na tuk, ktorý slúži ako rezervný zdroj energie.

2. Štruktúrne funkcie. Polárne lipidy sa spontánne orientujú do mono- a dvojvrstiev, čím vytvárajú štruktúrne jadro biomembrán. Polárne lipidy sú tiež nevyhnutné pre prenos podnetov, preto nervové tkanivo obsahuje až 40 % lipidov.

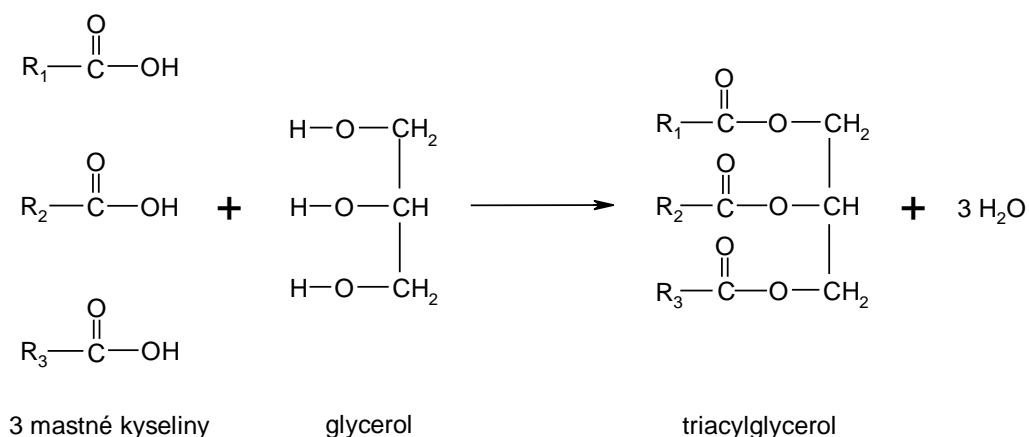
3. Ochranné funkcie. Časť acylglycerolov obaľuje niektoré orgány (napr. obličky) a chráni ich pred mechanickým poškodením. Podkožný tuk funguje ako izolačná bariéra zabraňujúca nadmernej strate tepla do okolia a tiež strate vody. Analogické funkcie plnia aj ochranné vrstvy voskov na listoch a plodoch rastlín, perí vtákov, srsti cicavcov, pancieri hmyzu.

Tuky a oleje

Tuky a oleje sú v rôznych formách známe každému z nás, najmä ako súčasť stravy (tuk v mäsových a maslo v mliečnych produktoch, margarín, majonéza, dressingy, pečené jedlá obsahujúce olej). Používame mydlá, ktoré sú vyrobené z tukov a olejov, a tiež farby. Vo všeobecnosti sa výrazy "tuk" a "olej" používajú ako synonymá. **Z technického hľadiska však "tuk" označuje tuk v pevnej forme** (zväčša živočíšneho pôvodu), **zatiaľ čo "olej" označuje kvapalný tuk** (predovšetkým z rastlín). Dnes sa pojmom "tuk" označuje celá skupina acylglycerolov, bez ohľadu na konzistenciu.

Niektoré tuky a oleje sú nevyhnutnou súčasťou našej potravy, lebo poskytujú **esenciálne mastné kyseliny** a absorbujú a transportujú v tukoch rozpustné vitamíny A, D, E a K. Špecifická funkcia esenciálnych mastných kyselín nie je stále známa, avšak deti a mláďatá majú spomalený rast v prípade ich nedostatku v strave. Ďalšími symptómami sú riedke vlasy, šupinatá koža, zlé hojenie sa rán.

Chemický charakter tukov a olejov bol prvýkrát študovaný v rokoch 1810 – 1820 francúzskym chemikom *Michel-Eugene Chevreul*. Zistil, že hydrolýza tukov a olejov vedie k tvorbe mastných kyselín a glycerolu. Tuky a oleje ako estery glycerolu a vyšších mastných kyselín sú často nazývané aj **acylglyceroly** alebo **triacylglyceroly**. Starší názov glyceridy, príp. triglyceridy sa už v súčasnej dobe nepoužíva. Štruktúrny vzťah medzi mastnými kyselinami, glycerolom a triacylglycerolom je zobrazený v nasledujúcej schéme:



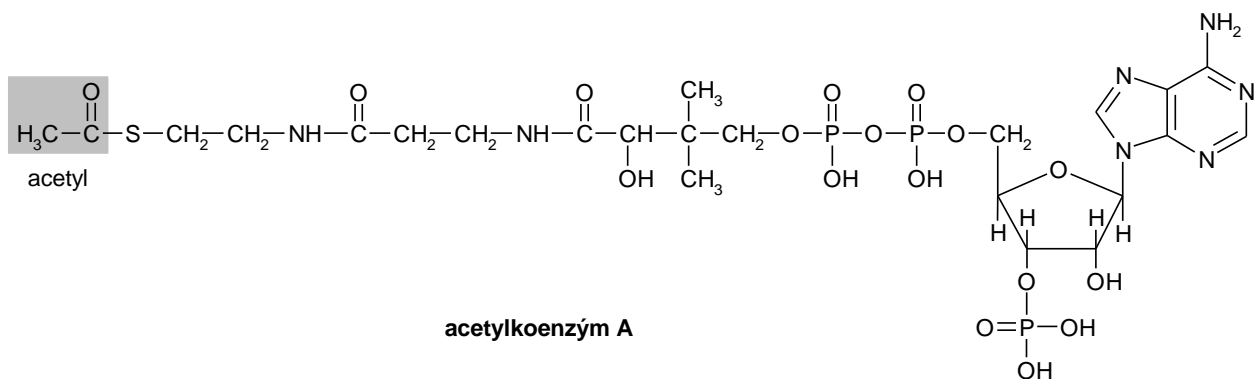
* R₁, R₂, R₃ predstavujú reťazce mastných kyselín, najčastejšie rôznych, ale môže ísť aj o jednu a tú istú masťnú kyselinu

V tukoch a olejoch bolo nájdených viac ako 100 mastných kyselín, dávajúc tak teoreticky možnosť existencie viac ako 500 000 rôznych triacylglycerolov. Väčšina mastných kyselín sa však nachádza v organizme iba v stopových množstvách a iba približne 10 z nich je dôležitou súčasťou triacylglycerolov. Názvy a štruktúry týchto mastných kyselín sú uvedené v **tabuľke 2.1**.

TABUĽKA 2.1 Prehľad bežných mastných kyselín			
Počet C	Názov	Štruktúra kyseliny	Poznámky #
C ₁₂	laurová	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	nasýtená
C ₁₄	myristová	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	nasýtená
C ₁₆	palmitová	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	nasýtená
	palmitolejová	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	mononenasýtená: 1 <i>cis</i> -dvojitá väzba (9)
C ₁₈	stearová	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	nasýtená
	olejová	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	mononenasýtená: 1 <i>cis</i> -dvojitá väzba (9)
	ricínolejová	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH(OH)CH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	mononenasýtená: obsahuje OH + 1 <i>cis</i> -dvojitú väzbu (9)
	linolová*	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	polynenasýtená: 2 <i>cis</i> dvojité väzby (9, 12)
	α-linolenová*	CH ₃ CH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	polynenasýtená: 3 <i>cis</i> dvojité väzby (9, 12, 15)
	γ-linolenová	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₄ COOH	polynenasýtená: 3 <i>cis</i> dvojité väzby (6, 9, 12)
	α-eleostearová	CH ₃ (CH ₂) ₃ CH=CHCH=CHCH=CH(CH ₂) ₇ COOH	polynenasýtená: 1 <i>cis</i> a 2 <i>trans</i> dvojité väzby (9, 11, 13)
C ₂₀	arachidónová*	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₄ CH ₂ CH ₂ COOH	polynenasýtená: 4 <i>cis</i> dvojité väzby (5, 8, 11, 14)

* esenciálne pre človeka
čísla v zátvorke udávajú pozície dvojitých väzieb v mastnej kyseline

Z **tabuľky 2.1** vyplýva, že väčšina bežných mastných kyselín má 12, 14, 16, 18 alebo 20 uhlíkových atómov a že všetky sú vytvorené z nerozvetvených reťazcov. Mastné kyseliny s 12 a 14 uhlíkmi sú nasýtené, zatiaľ čo u mastných kyselín so 16, 18 a 20 uhlíkovými atómami sa častokrát vyskytujú aj dvojité väzby. Väčšina dvojitých väzieb (môžu sa vyskytovať až 4 v jednom reťazci) je v *cis* konformácii. Zaujímavý fakt, že tieto mastné kyseliny obsahujú páry počet uhlíkových atómov poukazuje na spôsob ich biosyntézy, a to pridávaním dvojuhlíkového zvyšku pomocou **acetylkoenzýmu A**. Tvorbu dvojitých väzieb zabezpečujú ďalšie enzýmy, a to odstránením vodíkových atómov.



V súčasnosti je všeobecne známy význam "správnych" tukov v zdravej výžive. Vo všeobecnosti, rastlinné tuky sú lepšie ako živočíšne a polynenasýtené tuky sú lepšie, ako nasýtené. Dôvodom je cholesterol, ktorého nadmerné množstvo v krvnom riečišti vedie k **ateroskleróze** – k strate elasticity a zúženiu artérií v dôsledku usadzovania sa cholesterolu. Takáto usadenina môže viesť k výraznému obmedzeniu, príp. prerušeniu toku krvi k životne dôležitým orgánom ako mozog a srdce, a následne spôsobiť mŕtvicu alebo srdcový infarkt.

Rastlinné oleje sú považované za lepšie v porovnaní so živočíšnymi, pretože neobsahujú cholesterol. Avšak niektoré vysokonasýtené tuky, ako palmový olej (obsahuje 36 – 59 % nasýtených mastných kyselín) a kokosový olej (77 – 97 % nasýtených mastných kyselín), zvyšujú hladinu cholesterolu v krvi. Ich konzumácia môže mať preto horšie následky pre telo ako konzumácia niektorých živočíšnych tukov. Palmový a kokosový tuk sú lacné, preto sa komerčne využívajú pri výrobe koláčov a iných pečených výrobkov (ekonomika má často prioritu pred zdravou výživou).

Pre nenasýtené mastné kyseliny je známe alternatívne rozdelenie do skupín, a to na tzv. omega mastné kyseliny. Na základe tohto delenia existujú omega-3 (ω -3), omega-6 (ω -6) a omega-9 (ω -9) mastné kyseliny. Číslica za omegou predstavuje pozíciu prvej dvojitej väzby pri číslovaní od metylového konca uhl'ovodíkového reťazca mastnej kyseliny. Pre zdravú výživu sú dôležité najmä esenciálne polynenasýtené mastné kyseliny ako napr. kyselina α -linolenová (ω -3), kyselina linolová a kyselina arachidónová (obe ω -6). Klinické štúdie ukázali, že omega-6 polynenasýtené mastné kyseliny primárne prispievajú k znižovaniu hladiny cholesterolu v krvi a majú iba mierny účinok na hladinu triacylglycerolov. Na druhej strane, omega-3 polynenasýtené mastné kyseliny vplývajú na znižovanie hladiny cholesterolu iba nepatrne, ale pritom výrazne prispievajú k znižovaniu hladiny triacylglycerolov. Omega-3 mastné kyseliny majú ešte jeden zaujímavý fyziologický účinok, ktorý pravdepodobne prispieva k znižovaniu rizika srdcovo-cievnych ochorení – spôsobujú zníženie agregáciu krvných doštičiek.

Tabuľka 2.2 udáva percentuálne zastúpenie mastných kyselín v rôznych typoch živočíšnych a rastlinných tukov. Všimnite si **väčšie množstvo nasýtených mastných kyselín vo väčšine živočíšnych tukov v porovnaní s veľkým množstvom nenasýtených mastných kyselín v rastlinných tukoch**. Rybacie tuky majú vyššiu tendenciu obsahovať viac nenasýte-

ných mastných kyselín, z čoho vyplýva aj ich popularita v zdravej výžive. Vysoké percento mastných kyselín v rybách obsahuje 3 a viac dvojitých väzieb. Na druhej strane, ako bolo spomenuté, kokosový a palmový olej obsahuje vysoký podiel nasýtených mastných kyselín. Kokosový olej obsahuje dokonca vyššie percento nasýtených mastných kyselín, ako všetky uvedené živočíšne tuky. Slnečnicový a sójový olej sú zase výborným zdrojom polynenasýtených mastných kyselín.

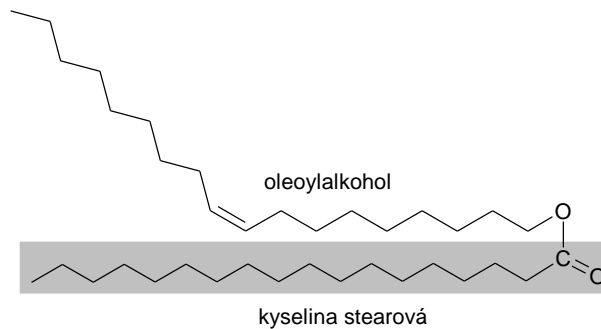
TABUĽKA 2.2 Zastúpenie mastných kyselín v niektorých živočíšnych a rastlinných tukoch

	Nasýtené mastné kyseliny (%)					Nenasýtené mastné kyseliny (%)			
	C ₄ -C ₁₂	Myristová	Palmitová	Stearová	Spolu	Olejová (1 d.v.)	Linolová (2 d.v.)	Linolénová (3 d.v.)	Spolu
<u>Živočíšne</u>									
Hovädzí tuk	1	6	27	14	48	49	2	0	52
Maslo	9-13	7-9	23-26	10-13	43-52	30-40	4-5	0	39-50
Bravčová masť	0	1-2	24-30	12-18	41-50	41-48	10	0	51-58
Treščí olej	0	5-7	8-10	0-1	13-18	27-33	27-32	0	82-88
Sladový olej	0	5	14	3	22	0	0	30	78
Sardinkový olej	0	6-8	10-16	1-2	17-26	6-10	27-11	8-12	78-85
<u>Rastlinné</u>									
Kokos	55-73	17-20	4-10	1-5	77-97	2-10	0-2	0	3-13
Kukurica	0	0-2	7-11	3-4	10-17	43-50	34-42	0	77-93
Bavlníkové semeno	0	0-3	17-23	1-3	18-29	23-44	34-55	0	71-82
Ľanové semeno	0	0	4-7	2-5	6-12	9-38	3-43	25-58	88-94
Olivy	0	0	5-15	1-4	6-19	69-84	4-12	2	81-94
Palma	0	1-6	32-47	3-6	36-59	38-42	5-11	0	43-58
Arašidy	0	0-1	6-9	2-6	8-15	50-70	13-26	2	85-92
Saflor	0	1	3	4	8	15	76	1	92
Slnečnica	0	1	6	5	12	21	66	1	88
Sója	0	0-1	10-13	2-5	12-19	21-29	50-59	2-10	81-88
Tung – čínsky drevný olej*	0	0	1-3	1-3	2-6	4-16	0-1	0	94-98

* približne 80 % tvorí kyselina α -eleostearová, čo v konečnom dôsledku prispieva k tak vysokému percentu nenasýtených mastných kyselín

Vosky

Medzi jednoduché lipidy patria okrem acylglycerolov aj **vosky**. Sú to vo vode nerozpustné tuhé estery mastných kyselín s monohydroxylovými alkoholmi s dlhým lineárnym alifatickým reťazcom alebo so sterolmi. Bežnými súčasťami voskov sú cetylalkohol (C_{16}), karnaubylalkohol (C_{24}), cerylalkohol (C_{26}) a myricylalkohol (C_{30}). Príklad molekuly vosku znázorňuje nasledujúci vzorec:



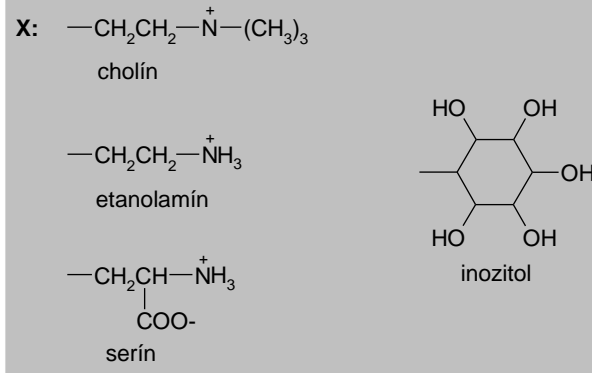
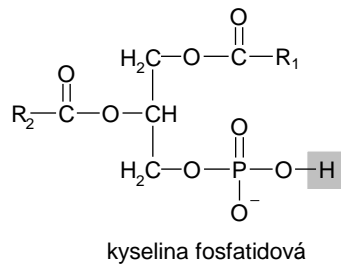
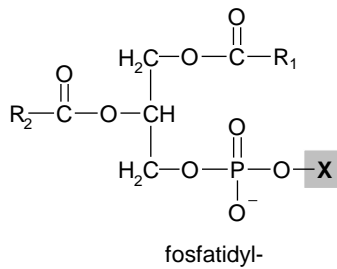
Vosky sú vylučované živočíchmi a rastlinami obvykle ako heterogénne zmesi esterov, často sprevádzané voľnými mastnými kyselinami a ich hydroxyderivátmi alebo vysokomolekulovými nerozvetvenými uhl'ovodíkmi. V živočíšnych voskoch prevládajú alkoholy so 14 až 18 uhlíkovými atómami, v rastlinných alkoholy s dlhším reťazcom, s 26 až 30 atómami uhlíka.

Vosky majú **ochranné funkcie**. Tvoria hydrofóbnu vrstvu na vonkajších častiach rastlín, listoch a plodoch. Táto vrstva bráni stratám vody, bráni nadmernému zmáčaniu povrchu a chráni pred napadnutím mikroorganizmami. U živočíchov sa vosky vylučujú na koži a srsti a včely ich používajú pri stavbe plástov.

Vosky sú značne hydrofóbne látky, tuhé pri izbovej teplote a mäkké až tekuté pri vyšších teplotách. Vzhľadom na podobné vlastnosti sú aj niektoré minerálne látky nazývané voskami; sú to napr. pevné uhl'ovodíky (parafínový vosk), extrakt z lignitu (montánný vosk), ozocerit a iné. Tieto produkty, rovnako ako prírodné vosky, sa široko uplatňujú v priemysle. Zo živočíšnych voskov sa v praxi používa hlavne **včelí** a **spermacetový** vosk (vorvanina) z lebečnej dutiny vorvaňa a **lanolín** (vosk ovčej vlny). Z rastlinných voskov je najpoužívanejším tzv. **karnaubský vosk**, ktorý sa vylučuje v hojnej miere na listoch palmy *Copernicia cerifera*. Má žltú až modrozelenú farbu, je veľmi tvrdý a krehký a topí sa pri 83 až 90 °C. Vosky sa používajú hlavne pri výrobe sviečok, krémov, mydiel a rôznych náplastí.

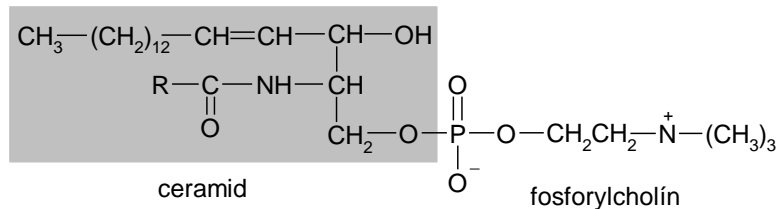
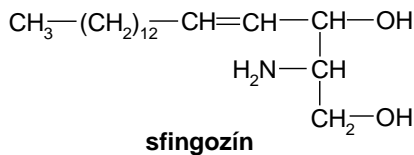
Fosfoacylglyceroly

Fosfoacylglyceroly (tiež nazývané fosfatidáty) patria do skupiny polárnych lipidov. Skladajú sa z hydrofóbnej a hydrofilnej časti, čo určuje ich **amfipatickú (amfifilnú) povahu**. Fosfoacylglyceroly sú súčasťou veľkej skupiny **fosfolipidov**, ktoré sú základnými stavebnými prvkami všetkých biomembrán a niektoré sa zúčastňujú prenosu vzruchu v nervovom tkanive. Vznikajú esterifikáciou zvyšku kyseliny fosforečnej vo fosfatidovej kyseline jedným z nasledujúcich alkoholov alebo aminoalkoholov: cholín, etanolamín, serín, inozitol, glycerol. Hydrofilnú časť týchto zlúčenín tvorí fosfát, hydrofóbná časť pozostáva zo zvyškov dvoch mastných kyselín:



Sfingomyelíny

Podobne ako fosfoacylglyceroly aj sfingomyelíny (tiež nazývané sfingofosfolipidy, ceramid-1-fosforylcholín) patria medzi polárne lipidy, fosfolipidy. Základom tejto skupiny fosfolipidov nie je glycerol, ale dlhý nenasýtený aminoalkohol **sfingozín**. Jeho aminoskupina tvorí amidovú väzbu s masťou kyselinou (**ceramid**) a primárny hydroxyl je esterifikovaný **fosforylcholínom**:



sfingomyelín

Sfingomyelíny tvoria dôležité zložky biomembrán a vyskytujú sa hojne v mozgu a nervovom tkanive.

Lipoproteíny

Lipoproteíny vznikajú spojením lipidov so špecifickými bielkovinami, **apolipoproteínmi**. K vzájomnému spojeniu dochádza pomocou hydrofóbných interakcií nepolárnych oblastí oboch zložiek. Výsledkom je, že bielkovina robí hydrofóbné lipidové štruktúry dispergovateľné a stabilné vo vodnom prostredí. Lipidové časti lipoproteínov tvoria najmä triacylglyceroly, ďalej fosfolipidy (lecitíny, sfingomyelíny), voľný a esterifikovaný cholesterol. Triacylglyceroly a estery cholesterolu tvoria lipofilné jadro lipoproteínovej častice. Apolipoproteíny, fosfolipidy a neesterifikovaný cholesterol tvoria jej obal, ktorý je hydrofilný.

Lipoproteíny sú súčasťou bunkových membrán, cytoplazmy buniek, krvnej plazmy a vajčného žltka. Najpreštudovanejšie sú **plazmové lipoproteíny**, ktoré zabezpečujú transport a distribúciu lipidov (vstrebávaných lipidov z potravy, lipidových hormónov a v tukoch rozpust-

ných vitamínov) prostredníctvom krvi a lymfatického systému. Fungujú tiež ako regulátory metabolizmu lipidov.

Na základe zloženia rozdeľujeme lipoproteíny do niekoľkých skupín (**tabuľka 2.3**):

■ **chylomikróny**. Tvorí sa v tenkom čreve. Z lipoproteínov sú najväčšie (viditeľné aj pod mikroskopom). Ich primárnou úlohou je transportovať triacylglyceroly z tenkého čreva do pečene.

■ **VLDL** (*very low-density lipoproteins*). Vznikajú v pečeni a transportujú triacylglyceroly z pečene do tukových a svalových buniek.

■ **IDL** (*intermediate-density lipoproteins*). Obyčajne sú v krvi nedetegovateľné.

■ **LDL** (*low-density lipoproteins*). Tie nie sú syntetizované priamo, ale tvoria sa z VLDL. LDL majú zo všetkých lipoproteínov najväčšie zastúpenie cholesterolu a esterov cholesterolu. Podieľajú sa najväčšou mierou na transporte cholesterolu z pečene do buniek.

■ **HDL** (*high-density lipoproteins*), ktoré vznikajú primárne v pečeni. "Zbierajú" nadbytočný cholesterol z tkanív a transportujú ho späť do pečene.

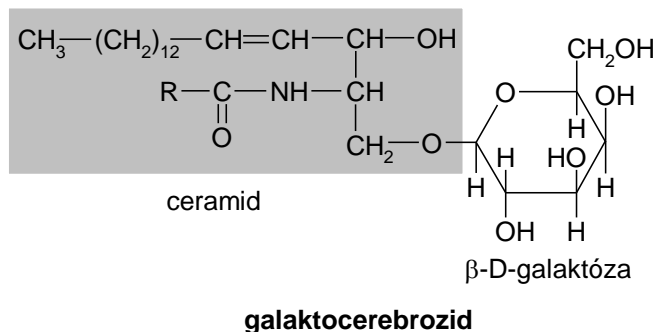
TABUĽKA 2.3 Zloženie a vlastnosti ľudských lipoproteínov

Skupina	Hustota (g/cm ³)	Priemer (nm)	Zloženie (% suchej hmotnosti)			
			proteíny	cholesterol	fosfolipidy	triacylglyceroly
chylomikróny	< 0,95	100 – 500	1 – 2	8	7	84
VLDL	0,95 – 1,006	30 – 80	10	22	18	50
IDL	1,006 – 1,019	25 – 50	18	29	22	31
LDL	1,019 – 1,063	18 – 28	25	50	21	4
HDL	1,063 – 1,21	5 – 15	33	30	29	8

Glykolipidy

Glykolipidy obsahujú jeden alebo viac monosacharidových zvyškov, ktoré sa viažu glykozidovou väzbou na lipidovú časť. Tá je tvorená buď mono- alebo diacylglycerolom, príp. sfingozínom alebo ceramidom. Neobsahujú kyselinu fosforečnú. Podľa charakteru sacharidovej zložky ich môžeme rozdeliť na dve skupiny:

■ **cerebrozidy**, ktoré obsahujú ceramid s mastnou kyselinou alebo hydroxymastnou kyselinou a ako hydrofilnú časť jediný zvyšok monosacharidu viazaného β-glykozidovou väzbou na C-1. Poznáme **galaktocerebrozidy** (obsahuje sacharid D-galaktózu) a **glukocerebrozidy** (obsahuje sacharid D-glukózu).



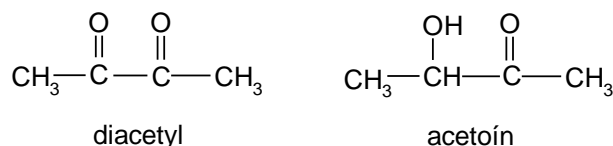
Cerebrozidy tvoria 11 % suchej hmoty mozgu, tiež sú prítomné v nervovom tkanive, týmuse, obličkách, nadobličkách, pľúcach a vaječnom žltku.

■ **glykosfingolipidy**. Predstavujú zložitejšie deriváty ceramidu, v ktorých sa na primárnu alkoholovú skupinu sfingozínu glykozidovou väzbou viaže lineárny alebo vetvený oligosacharidový reťazec. Ten pozostáva z kombinácie galaktózy, glukózy a ich *N*-acetylaminoderivátov. Často obsahuje aj jeden alebo viac zvyškov sialových kyselín, nesúcich záporný náboj. Tieto kyslé sialylglykosfingolipidy nazývame **gangliozidy**. Vyskytujú sa hlavne v šedej mozgovej kôre. Podieľajú sa tiež na špecificite krvných skupín a na orgánovej a tkanivovej špecificite.

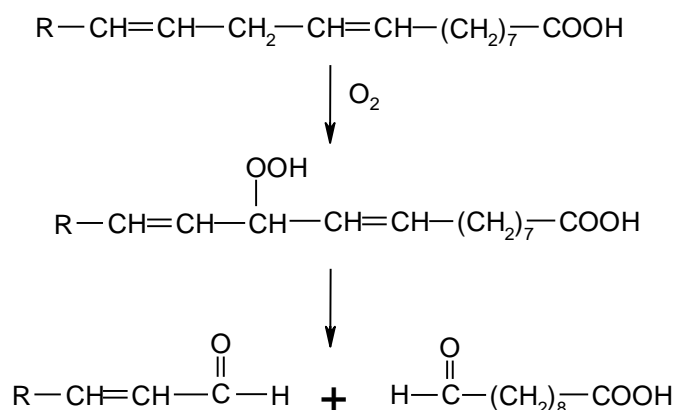
CHEMICKÉ VLASTNOSTI LIPIDOV

Zvyšujúci sa podiel nenasýtených mastných kyselín vedie k znižovaniu teploty topenia tukov. Táto závislosť vysvetľuje, prečo sú nenasýtené tuky kvapalné, a väčšina nasýtených tukov tuhé latky.

Margarín sa získava z rastlinných olejov čiastočnou **hydrogenáciou** až do dosiahnutia vhodnej konzistencie. Hoci výsledný produkt nie je zo zdravotného hľadiska až taký hodnotný ako pôvodný olej, je stále oveľa lepší ako maslo alebo masť. Margarín sa mieša s β -karoténom pre získanie vhodnej farby, s mliekom za vzniku emulzie a soľou, diacetylom a acetoínom kvôli chuti:



Niektoré tuky sa môžu pokaziť (stuchnúť) – majú nepríjemnú chuť a zápach, keď sú ponechané pôsobeniu vzduchu a tepla. Jedným z dôvodov, ktoré to spôsobujú, je, že vlhkosť zo vzduchu má za následok **hydrolýzu** tukov za vzniku nepríjemne zapáchajúcich a chutiacich mastných kyselín, ako napr. kyseliny butylovej z pokazeného masla. Iným dôvodom je **oxidácia mastných kyselín** za vzniku hydroperoxidov. Tieto hydroperoxydy sa môžu rozkladať za vzniku nízkomolekulových aldehydov s nepríjemnými dôsledkami na naše chuťové a čuchové bunky:



Vysokoenasýtené tuky ako napr. z ľanového semena a tungu, v dôsledku pôsobenia vzduchu tvrdnú a vytvárajú priehľadný, hladký povrch (oxidáciou a polymerizáciou dvojitých väzieb). Tieto oleje sa často používajú v priemysle v náteroch a farbách.

Pri charakterizácii tukov a olejov sa používajú dve číselné hodnoty – **číslo zmydelnenia** a **jódové číslo**.

Číslo zmydelnenia je definované ako množstvo miligramov KOH potrebných na kompletnú premenu 1 gramu tuku na glycerol a mydlo. Vysoké číslo zmydelnenia preto indikuje

nízkomolekulový tuk. Napríklad kokosový olej má vyššie číslo zmydelnenia ako olivový olej, pretože kokosový olej obsahuje väčšie množstvo nízkomolekulových mastných kyselín.

Jódové číslo je kvantitatívna miera množstva nenasýtených väzieb prítomných v danom tuku. Je definované ako množstvo jódu potrebného saturať 100 gramov tuku. Preto vyššie jódové číslo znamená viac nenasýtený tuk. Jódové číslo môže dosahovať relatívne malé hodnoty, a to 8 až 10 v prípade vysokonasýteného tuku ako kokosový olej, alebo hodnoty 175 – 205 pre vysokonenasýtený tuk ako napr. z ľanového semena.

IZOLÁCIA A STANOVENIE LIPIDOV

Rastlinné tuky a oleje sa izolujú tromi základnými metódami:

- tlakom za studena,
- tlakom za tepla,
- extrakciou z roztoku.

Pri tlaku za studena sa vytlačá olej z rastlín pôsobením hydraulického lisu. Tlak za tepla je principiálne tá istá metóda ako tlak za studena s tým rozdielom, že sa uskutočňuje pri vyššej teplote. Tlak za tepla je efektívnejšia metóda, avšak dáva produkt nižšej kvality v dôsledku prítomnosti nežiaducich zložiek v získanej zmesi. Extrakcia z roztoku je najdrahšia, avšak s najväčším výťažkom a produktom vysokej kvality.

Živočíšne tuky sa zvyčajne získavajú vyvarením tuku z tkanív pri vysokých teplotách. Alternatívne, tukové tkanivo môže byť vyvarené vo vode. Vyvarený tuk takto vytvorí vrchnú plávajúcu vrstvu a môže byť ľahko separovaný.

Pri mnohých experimentoch je dôležité určiť celkový obsah lipidov v biologickej vzorke. Jednými z najbežnejších metód, ako vyextrahovať lipidy z biologického materiálu, sú metódy podľa **Bligha** a **Dyera** (1959) (**tabuľka 2.4**) a metóda podľa **Folcha** (1957). Obidve metódy sú založené na jednoduchom triku, a to takom, že zmes chloroform/metanol/voda v pomere 1:2:0,8 sú veľmi dobre miešateľné. Takto môžu preniknúť do tkanív a v dôsledku prítomnosti lipofilného chloroformu môžu byť lipidy extrahované. K oddeleniu vodnej a organickej fázy dôjde po zmene uvedeného pomeru na 2:2:1,8 v prípade **Bligh** a **Dyer** metódy, alebo na 8:4:3 v prípade metódy podľa **Folcha**. Extrahované lipidy sa nachádzajú v organickej fáze, teda v chloroforme.

TABUĽKA 2.4 Bligh & Dyer – extrakcia fosfolipidov

1. Ku vzorke s objemom 0,8 ml pridáme 3 ml zmesi chloroform/metanol 1/2 (v/v). Vortex.
 2. Pridáme 1 ml chloroformu. Vortex.
 3. Pridáme 1 ml 100 mM NaCl. Vortex.
 4. Rozdelenie vrstiev urýchlíme centrifugáciou cca 4 minúty. V spodnej (chloroformovej) vrstve sa nachádzajú extrahované fosfolipidy.
-

Veľmi jednoduchou a rýchlou metódou na kvalitatívnu, ale aj kvantitatívnu (po miernej modifikácii) analýzu fosfolipidov je metóda **chromatografie na tenkej vrstve** (*TLC plate analysis*, *TLC = thin-layer chromatography*). Chromatografia na tenkej vrstve je jednou z najbežnejších experimentálnych metód na odhadnutie čistoty organických zlúčenín. Čistota zlúčeniny sa určuje na základe množstva zložiek (škvrn) na platničke. TLC metóda sa používa na potvrdenie štruktúry neznámej zlúčeniny na základe porovnania jej pohyblivosti so známou vzorkou. TLC analýza sa často používa na sledovanie postupu chemickej reakcie. TLC využíva tenkú vrstvu práškoveho adsorbentu (zvyčajne SiO₂ alebo Al₂O₃) na pevnom podklade (zvyčajne sklo, hliníková platnička alebo plast). Na elučný profil podklad nemá vplyv. Dôležitý je charakter adsorbentu a vyvíjacej/elučnej zmesi. TLC platnička sa kladie do takmer

vertikálnej polohy. Elučná zmes (mobilná fáza) bude na základe kapilárnych síl vzlínať smerom hore. Zlúčenina dobre rozpustná v danej zmesi bude vzlínať s ňou. Naopak zlúčenina slabšie rozpustná ostane, resp. sa bude pohybovať pomalšie. Inými slovami, ako ďaleko sa daná zlúčenina dostane závisí na tom, ako silno je adsorbovaná na povrch (stacionárnu fázu) v porovnaní s tým, ako dobre sa rozpúšťa v mobilnej fáze. Určitá zlúčenina na určitom povrchu a v určitej mobilnej fáze je charakterizovaná určitou hodnotou R_f , ktorá určuje vzdialenosť, ktorú daná zlúčenina prešla, delená vzdialenosťou, ktorú prešla mobilná fáza. Na základe súboru vhodných štandardov a porovnania ich mobility s neznámou zlúčeninou môžete odhadnúť vlastnosti tejto látky.

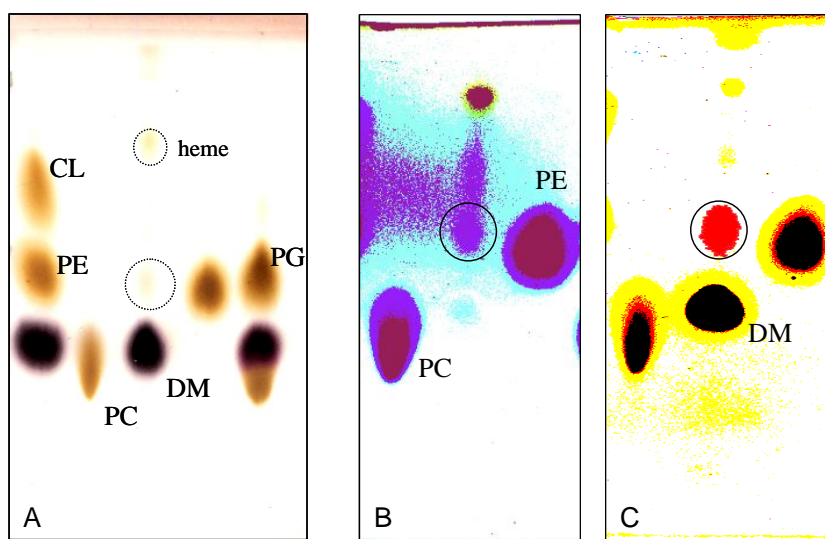
TLC meranie prebieha tak, že na pripravenú TLC platničku sa na jej spodný okraj naniesie vo forme malej (čo najmenej) škvrny študovaná zlúčenina, resp. zmes látok. Mobilná fáza sa nechá vzlínať, až dosiahne opačný koniec platničky (tento proces prebieha v uzavretej nádobe). TLC platnička sa nechá vyschnúť a na zviditeľnenie zlúčenín sa použije vhodná rozprašovacia metóda s vhodným činidlom.

Najbežnejšie **mobilné fázy** na separáciu lipidov sú:

- (i) **chloroform:metanol:voda (65:25:4) (v/v/v)** na separáciu fosfolipidov podľa polaritu hlavičky,
- (ii) **chloroform:metanol:hydroxid amónny (65:25:4)** na separáciu fosfolipidov podľa polaritu a náboja hlavičky,
- (iii) **chloroform:hexán:metanol:kyselina octová (50:30:10:5)** na separáciu kardiolipínu a fosfatidylglycerolu,
- (iv) **toluén:pyridín:voda (60:60:10)** na separáciu fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolínu,
- (v) **cyklohexán:etylacetát (3:2)** na separáciu neutrálnych lipidov (mastné kyseliny, triacylglyceroly, diacylglyceroly, monoacylglyceroly),
- (vi) **toluén:chloroform:metanol (85:15:5)** na separáciu diacylglycerolov,
- (vii) **toluén:metanol (7:3)** na separáciu ceramidu od ostatných sfingolipidov.

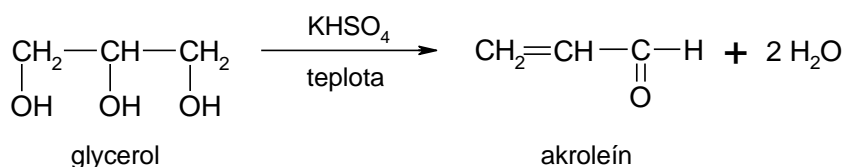
Najbežnejšie **činidlá** používané na **detekciu škvŕn** na TLC platničke sú tie, ktorými možno detegovať **fosfor** (roztok na báze MoO_3), **amíny** (roztok na báze ninhydrínu) a **uhlík** (6 M H_2SO_4). Po navlhčení platničky detekčným roztokom sa platnička zahreje do objavenia škvŕn modrej farby pri detekcii fosforu, fialovej až čiernej pri detekcii amínových skupín a čiernej pri detekcii uhlíkového reťazca.

Na nasledujúcom obrázku je vidieť výsledok TLC analýzy niektorých typov lipidov:



Obrázok 2.1 (*predchádzajúca strana*) TLC analýza fosfolipidov v elučnom roztoku **chloroform:metanol:ľadová kyselina octová:acetón:voda** v objemovom pomere **50:10:10:20:5**. Obrázok **B** a **C** predstavuje tú istú platničku – v časti **B** bol použitý roztok na detekciu fosforu a v časti **C** roztok na detekciu uhlíka. Analýza v časti **B** a **C** úspešne potvrdila prítomnosť pevne viazaného PE v nanomolárnom množstve membránového proteínu v súlade s jeho kryštálovou štruktúrou. Skratky označujú: CL – kardiolipín, PE – fosfatidyletanolamín, PC – fosfatidylcholín, DM – dodecylmaltozid (detergent). (*Poznámka*: Farby na **B** a **C** nezodpovedajú skutočnosti – odrážajú farebné "cítienie" autora.)

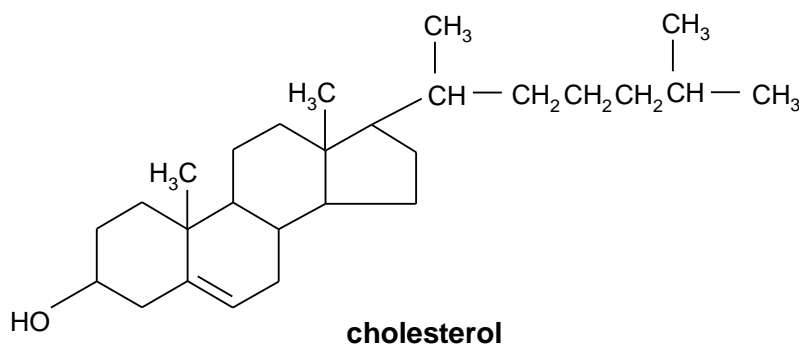
Pre zaujímavosť uvádzame aj jednoduchý test na detekciu glycerolu v tuku. Je to tzv. **akroleínový test**. Spočíva v tom, že glycerol je v prítomnosti KHSO_4 za mierneho zahrievania dehydratovaný a oxiduje sa na akroleín (propenal) s veľmi typickým štiplavým a dráždivým zápachom. Reakcia prebieha nasledovne:



Cholesterol

Cholesterol je najčastejšie sa vyskytujúci steroid u živočíchov. Nachádza sa vo všetkých tkanivách, s najväčšou koncentráciou v mozgu, mieche a nervoch.

Celkové množstvo cholesterolu u priemerného dospelého človeka je 200 – 300 g. Kvôli množstvu a všade prítomnosti bol cholesterol izolovaný a charakterizovaný ako prvý steroid. Kvôli relatívne komplikovanej štruktúre prešlo od jeho izolácie v roku 1775 viac ako 150 rokov, kým sa podarilo určiť jeho štruktúru, a to v roku 1932. Keďže cholesterol obsahuje 8 asymetrických centier a môže existovať v 256 stereoizomérnych formách, trvalo ďalších 23 rokov do určenia jeho kompletnej 3D štruktúry.



Cholesterol je všeobecne rozšírený u eukaryotov, ale nevyskytuje sa u väčšiny prokaryotov. V relatívne vysokej koncentrácii sa vyskytuje v každej živočíšnej bunke a tvorí významnú časť jej plazmatickej membrány a moduluje jej tekutosť a permeabilitu (priepustnosť). Vo väčšej miere je prítomný v mozgu (tvorí asi 10 % jeho sušiny), v žlči, krvnej plazme (asi 2 mg/cm^3), kde je esterifikovaný nenasýtenými masnými kyselinami a tvorí súčasť plazmových lipoproteínov, ďalej v nadobličkách, nervovom tkanive, kde je súčasťou myelínových obalov nervových buniek, v mieche, vo vaječnom žltku a v tuku z ovčej vlny. Ľudská koža vylučuje až 300 mg cholesterolu denne ako ochrannú látku. Cholesterol tvorí hlavnú súčasť tzv. nezmydeliteľných podielov živočíšnych tukov. Kľúčový význam cholesterolu je daný tiež tým, že je východnou látkou pre biosyntézu ďalších dôležitých steroidov – žľčových ky-

selín, pohlavných hormónov, hormónov kôry nadobličiek (glukokortikoidy, mineralokortikoidy) a kalciferolov (vitamín D).

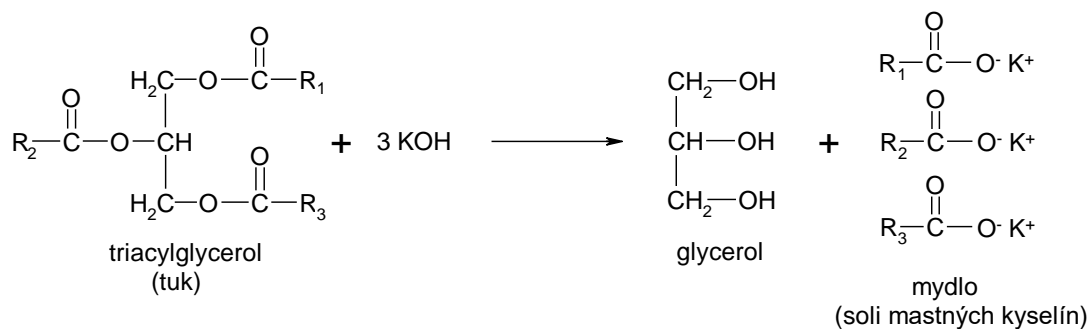
Organizmus kryje časť spotreby cholesterolu príjmom z vonku (potravou), väčšinu však syntetizuje (denne vyrába viac než 1 g cholesterolu). Hladina cholesterolu je udržiavaná poklesom biosyntézy pri jeho príjme v potrave. Cholesterol sa z väčšej časti vylučuje po preme na žľčovú kyselinu v pečeni. Nepremenená časť sa odbúrava činnosťou črevných baktérií, redukciou na koprostanol (5- β -cholestan-3- β -ol). Patologicky sa cholesterol ukladá v stenách krvných ciev (**ateroskleróza**) a v žľových kameňoch.

Mydlá a detergenty

Výroba mydla patrí k najstarším známym organickým syntézam, hneď druhá v poradí za výrobou etanolu. Ako prví zvládli výrobu mydla pravdepodobne Feničania v roku 600 pred našim letopočtom a to z kozieho tuku a popola. Mydlo bolo veľmi rozšírené počas Rímskej ríše a ruiny továrne na mydlo staršie viac ako 2000 rokov boli nájdené pri vykopávkach v Pompejoch.

Skutočný význam mydla pre umývanie a čistotu bol pravdepodobne uvedený, minimálne zdokumentovaný, až oveľa neskôr, približne v 2. storočí nášho letopočtu. Nasledujúce stovky rokov bolo použitie mydla výrazne obmedzené – pach tela bolo pohodlnejšie prekonávať parfémami.

K "zľudoveniu" mydla došlo až po zdokonalení jeho výroby v roku 1700 *Nicolasom Leblancom*. Výroba mydla predstavuje alkalickú hydrolyzu alebo saponifikáciu tuku alebo oleja, čo vedie k vzniku mydla a glycerolu. Ako bolo spomenuté vyššie, tuk pozostáva zo zmesi organických molekúl – triacylglycerolov – esterov nerozvetvených dlhých mastných kyselín, obsahujúcich 12 až 18 uhlíkových atómov. Mydlo pozostáva zo zmesi solí mastných kyselín, ktoré vznikajú v dôsledku alkalického hydrolyzy triacylglycerolov:



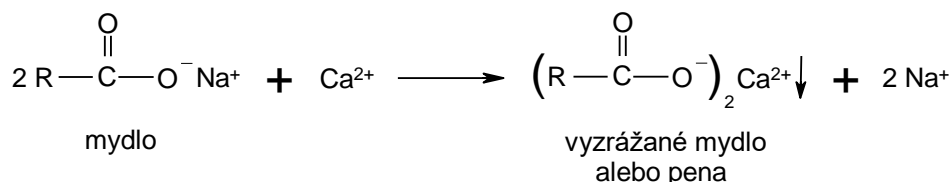
Metóda výroby mydla ostala prakticky nezmenená počas posledných niekoľko stoviek rokov. Mydlá sa môžu líšiť zložením a spôsobom úpravy (prídavky voňavých látok, germicídov, atď.). Pridaný alkohol spôsobuje spriehľadnenie mydla. Ak sa použije namiesto sodíka draslík, mydlo je mäkkšie.

Napriek týmto variáciám, mydlo ostáva z chemického hľadiska rovnaké a čistí tým istým spôsobom. Molekula mydla má **polárnu**, vo vode rozpustnú, "hlavičku" $-\text{COO}^-$, a dlhý **nepolárny**, vo vode nerozpustný, "chvost", pozostávajúci z nepolárnej časti mastnej kyseliny. To im dodáva **amfipatickú povahu** podobne ako v prípade fosfolipidov. Voda a olej majú tendenciu vytvárať separované vrstvy, avšak v prítomnosti mydla dochádza k zmene situácie. Dlhá nepolárna časť molekuly mydla sa rozpustí (interaguje) s olejovými kvapôčkami, zatiaľ čo polárna časť je v styku s vodou. Každá olejová kvapôčka je takto obklopená negatívnym nábojom, ktorý spôsobuje vzájomné odpudzovanie takto vytvorených nabitých sfér, bráni tak

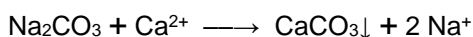
vytvoreniu olejovej fázy a stabilizuje olejové kvapôčky vo vode. Keďže olej drží špinu, príp. je časťou špiny, emulzifikácia oleja uvoľní "špinu" a umožňuje jej spláchnutie.

Biodegradabilný charakter mydla je výhodou pre prostredie. Dlhé, lineárne molekuly mydla môžu byť ľahko degradovateľné mikroorganizmami na oxid uhličitý a vodu, nezaťažujú tak prostredie jazier a potokov.

Mydlá majú nižšiu efektívnosť v tvrdej vode, v dôsledku prítomnosti vápnika, magnézia a soli železa, ktoré reagujú s mydlom za vzniku nerozpustných precipitátov, známych ako "kruhy" vo vani, v umývadle. Tieto precipitáty vznikajú v dôsledku nasledujúcej reakcie:



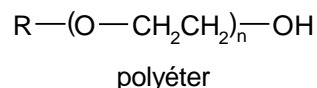
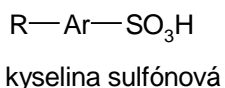
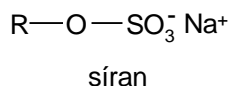
a spôsobujú, že časť mydla ostane nevyužitá vo forme precipitátu, preto je potrebné použiť väčšie množstvo mydla. Tento problém môže byť čiastočne odstránený pridaním zmäčkovadiel ako uhličitan sodný, ktorý vyzrážava ióny vápnika v tvrdej vode:



Nanešťastie, tieto vyzrážané ióny sa usadzujú v látkach a spôsobujú stratu ich farby.

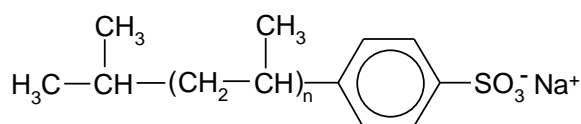
Tento problém nevzniká pri použití detergentov. Syntetické detergenty sa môžu výrazne líšiť v chemickej štruktúre, avšak všetky majú podobnú skladbu: **polárnu, vo vode rozpustnú** hlavičku, zvyčajne obsahujúcu síran alebo sulfónovú kyselinu, príp. polyéterovú skupinu a dlhý, **nepolárny** chvost.

Typy syntetických detergentov



Polárna hlavička a dlhý nepolárny chvost pôsobia na špinu tým istým mechanizmom ako mydlo. Avšak vďaka polárnej hlavičke iného charakteru, ktorú obsahujú detergenty, nevytvárajú nerozpustné agregáty v ťažkej vode. Výsledkom je väčšia čistiaca efektívnosť detergentov v tvrdej vode bez potreby pridávania zmäčkovadiel.

Prvý syntetický detergent bol vyrobený v roku 1916 *Fritzom Guntherom*. Tento produkt sa používal v priemysle, ale nebol použiteľný v domácnostiach. Prvý syntetický, v domácnostiach použiteľný detergent, uviedla na trh firma Procter & Gamble v roku 1933. Tieto produkty však boli relatívne drahé a lacnejší produkt – na báze alkylbenzénsulfonátu – sa dostal na trh až v roku 1950:

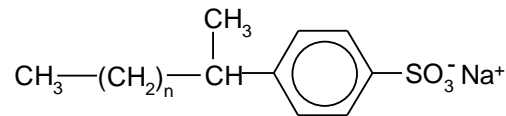


rozvetvený alkylbenzénsulfonát

Tento typ detergentu sa stal veľmi populárnym a rýchlo nahradil mydlo ako čistiaci prostriedok. Rozvetvené reťazce v molekule však spôsobili problém, pretože bakteriálne enzýmy

v čističkách neboli schopné štiepiť tieto molekuly. Týmto detergentom boli znečistené mnohé jazerá a vodné zdroje, dokonca sa našiel v pitnej vode mnohých miest.

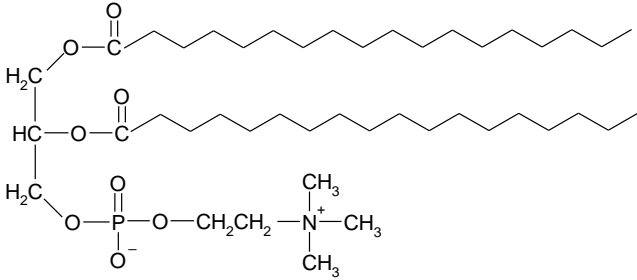
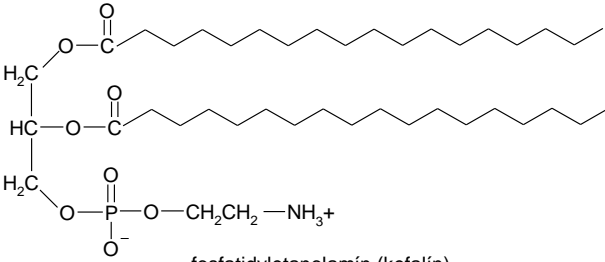
Našťastie, tento problém bol vyriešený náhradou rozvetvených reťazcov za lineárne, čo malo za následok biodegradabilitu detergentu:



lineárny alkylbenzénsulfonát

Použitá literatúra

- Barna K., Paščenko A. Je., Barnová E., Guzy J.: Lekárska chémia a biochémia, 3. prepracované vydanie, Košice 1989.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J., 1959, A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Devlin T. M.: *Textbook of biochemistry with clinical correlations*, 6th edition, John Wiley & Sons, New York 2005.
- Eaton D. C.: *Laboratory investigations in organic chemistry*, McGraw-Hill, Inc., New York 1989.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G. H. S., 1957, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Podhradský D., Mihalovová H.: *Praktické cvičenia z biochémie*, Košice 1989.
- Stryer L.: *Biochemistry*, 8th edition, W.H. Freeman and Company, New York 2015.
- Vodrážka Z.: *Biochemie*, 2. vydanie, Academia, Praha 2002.

TÉMA	LIPIDY
Úloha 9:	Izolácia fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolamínu zo žltka
Princíp:	<p>Vaječné žltko obsahuje množstvo lipidov (fosfatidylcholín, fosfatidyletanolamín), steroidy (cholesterol) a karotenoidy. Fosfatidylcholín je bezfarebná, na vzduchu hnednúca kryštalická látka, ktorá je súčasťou biomembrán a okrem vaječného žltka sa hojne nachádza aj v mozgovom a nervovom tkanive. Fosfatidylcholín a fosfatidyletanolamín je možné extrahovať etanolom.</p> <div style="text-align: center;">  <p>fosfatidylcholín (lecitín)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>fosfatidyletanolamín (kefalin)</p> </div>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. vaječný žltok 2. etanol 3. éter (dietyléter) 4. acetón (dimetylketón) 5. 10 % etanolový roztok chloridu kademnatého
Materiál:	sklenená tyčinka, centrifugačné skúmavky, centrifúga, filtračný lievik, filtračný papier, odparovacia miska, varič, miska s vodou, kadička s objemom 100 ml, odmerný valec s objemom 25 ml, pinzeta
Postup:	<p>Odmerným valcom zmeriame objem vaječného žltka (hodnotu zapíšeme do zošita) a rozmiešame ho s 10 ml etanolu, ktorý pridávame po kvapkách. Potom pridáme 15 ml éteru a rozmiešame. Zrazeninu bielkovín odstredíme v centrifúge (10 minút pri 3000 ot/min, 1000 g). Supernatant prelejeme do odparovacej misky a odparíme na vodnom kúpeli do sirupovitej konzistencie. Po ochladení na laboratórnu teplotu k nemu pridáme 10 ml acetónu, rozmiešame a necháme ustáť. Žltu sfarbenú kvapalinu zlejeme, znova pridáme 10 ml acetónu a tento postup opakujeme dovtedy, až je acetón bezfarebný. Potom zrazeninu rozpustíme v 10 ml etanolu. Do tohto roztoku pridáme 5 – 10 ml etanolového roztoku chloridu kademnatého do vytvorenia novej zrazeniny, ktorú tvoria kademnaté soli fosfatidylcholínu (lecitínu) a fosfatidyletanolamínu (kefalínu). Následne pridáme 5 – 10 ml éteru. Časť zrazeniny sa rozpustí v dôsledku rôznych rozpustností kademnatej soli lecitínu a kademnatej soli kefalínu v éteri: kademna-</p>

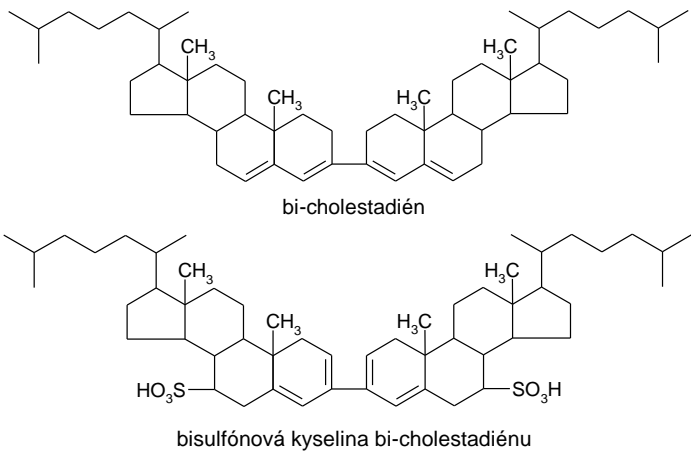
	tá soľ kefalínu sa v éteri rozpúšťa a kademnatá soľ lecitínu zostáva nerozpustená. Zrazeninu (lecitín) prefiltrujeme, vysušíme a odvážime. Filtrát (kefalin) odparíme, odparok vysušíme a odvážime.
Vyhodnotenie:	Hmotnosť lecitínu vydáme objemom žltka, čím získame jeho koncentráciu v žltku (v mg/ml). Rovnako vypočítame aj koncentráciu kefalínu.
Záver:	Uvedieme koncentrácie lecitínu a kefalínu vo vaječnom žltku (v mg/ml).

TÉMA	LIPIDY
Úloha 10:	Stanovenie jódového čísla tukov Yasudovou metódou
Princíp:	<p>Jódové číslo je mierou nenasýtenosti tukov a vyjadruje sa ako množstvo jódu v gramoch, ktoré sa viaže na 100 g tuku.</p> <p>Pri typickom experimente reaguje tuk s roztokom bromidu jódneho (IBr v kyseline octovej, Hanusov roztok), ktorý sa aduje na dvojitú väzbu mastných kyselín:</p> $-\text{CH}=\text{CH}- + \text{IBr} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{I} \quad \text{Br} \\ \quad \\ -\text{CH}-\text{CH}- \end{array}$ <p>Nezreagovaný bromid jódny reaguje s jodidom draselným, pričom vzniká jód:</p> $\text{IBr} + \text{KI} \longrightarrow \text{KBr} + \text{I}_2$ <p>I₂ sa následne stanovuje titráciou s tiosíranom sodným (Na₂S₂O₃) podľa nasledujúcej rovnice:</p> $2 \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + \text{I}_2 \longrightarrow \text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6 + 2 \text{NaI}$ <p style="text-align: center;">tetrationát sodný</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 10 % roztok jodidu draselného 0,005 M roztok tiosíranu sodného adičné činidlo: <ol style="list-style-type: none"> roztok pripravíme zo 40 ml ľadovej kyseliny octovej a 16 g čistého pyridínu. roztok pripravíme zo 40 ml ľadovej kyseliny octovej a 10,9 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. <p>Obidva roztoky zlejeme a ochladíme. Pridáme 5 ml brómu rozpusteného v 40 ml ľadovej kyseliny octovej. Objem roztoku zriedime ľadovou kyselinou octovou do 2000 ml. Pri mikrometóde (v našom prípade) riedime tento roztok kyselinou octovou v pomere 1:4.</p> <ol style="list-style-type: none"> chloroform 1 % škrobový maz vzorky tukov rozpustené v chloroforme (0,6 g/50 ml)
Materiál:	kuželové banky so zábrusnou zátkou (3 ks), byreta s objemom 10 ml, sklenené pipety s nadstavcom
Postup:	<p>Pripravíme si tri kuželové banky so zábrusnou zátkou. Do dvoch z nich odpipetujeme po 0,5 ml z pripraveného chloroformového roztoku tuku (vyberieme si jednu z troch vzoriek). Do tretej banky (slepý pokus) napipetujeme 0,5 ml chloroformu. Do všetkých troch baniek pridáme z byrety v digestore 5 ml adičného činidla. Banky zazátkujeme a necháme reagovať pri laboratórnej teplote 30 minút. Pripipetujeme 0,5 ml roztoku jodidu draselného, zriedime malým množstvom (3 – 5 ml) vody (opláchneme ňou steny banky) a titrujeme 0,005 M roztokom tiosíranu sodného do odfarbenia roztoku. Ako indikátor použijeme 1 % škrobový maz, ktorý prikvapneme na začiatku titrácie (2 – 4 kvapky).</p>
Vyhodnotenie:	<p>Zo spotrieb Na₂S₂O₃ pri titrácii oboch vzoriek vypočítame priemernú hodnotu, ktorú spolu so spotrebou pri titrácii slepého pokusu použijeme na výpočet jódového čísla podľa vzťahu:</p> $\text{jódové}_\text{ číslo} = \frac{(V_{SL} - V_{VZ}) \cdot 12,69 \cdot c}{m}$ <p>kde V_{SL} je spotreba Na₂S₂O₃ pri titrácii slepého pokusu (v ml), V_{VZ} je priemerná spotreba Na₂S₂O₃ pri titrácii vzoriek (v ml),</p>

	<p>m je hmotnosť titrovanej vzorky tuku (v gramoch), c je koncentrácia $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,005 M).</p> <table border="1"> <tr> <td colspan="4">TABUĽKA 2.5 Jódové čísla vybraných tukov*</td> </tr> <tr> <td>kokosový olej</td> <td>6 – 11</td> <td>arašidový olej</td> <td>86 – 107</td> </tr> <tr> <td>kravské maslo**</td> <td>26 – 40</td> <td>repkový olej</td> <td>110 – 126</td> </tr> <tr> <td>bravčová masť**</td> <td>45 – 70</td> <td>slnečnicový olej</td> <td>118 – 145</td> </tr> <tr> <td>olivový olej</td> <td>75 – 94</td> <td>ľanový olej</td> <td>170 – 203</td> </tr> <tr> <td colspan="4">* <i>The Lipid Handbook</i>, F. D. Gunstone, J. L. Harwood, A. J. Dijkstra, 3. vydanie, 2007, CRC Press</td> </tr> <tr> <td colspan="4">** https://oilpalmblog.wordpress.com/2014/08/31/quality-and-identity-characteristics-part-2-chemical-characteristics/ [citované: 21.6.2020]</td> </tr> </table>	TABUĽKA 2.5 Jódové čísla vybraných tukov*				kokosový olej	6 – 11	arašidový olej	86 – 107	kravské maslo**	26 – 40	repkový olej	110 – 126	bravčová masť**	45 – 70	slnečnicový olej	118 – 145	olivový olej	75 – 94	ľanový olej	170 – 203	* <i>The Lipid Handbook</i> , F. D. Gunstone, J. L. Harwood, A. J. Dijkstra, 3. vydanie, 2007, CRC Press				** https://oilpalmblog.wordpress.com/2014/08/31/quality-and-identity-characteristics-part-2-chemical-characteristics/ [citované: 21.6.2020]			
TABUĽKA 2.5 Jódové čísla vybraných tukov*																													
kokosový olej	6 – 11	arašidový olej	86 – 107																										
kravské maslo**	26 – 40	repkový olej	110 – 126																										
bravčová masť**	45 – 70	slnečnicový olej	118 – 145																										
olivový olej	75 – 94	ľanový olej	170 – 203																										
* <i>The Lipid Handbook</i> , F. D. Gunstone, J. L. Harwood, A. J. Dijkstra, 3. vydanie, 2007, CRC Press																													
** https://oilpalmblog.wordpress.com/2014/08/31/quality-and-identity-characteristics-part-2-chemical-characteristics/ [citované: 21.6.2020]																													
Záver:	Nami zistenú hodnotu jódového čísla vzorky tuku porovnáme s tabuľkovou hodnotou a uvedieme o aký tuk išlo. Výsledok zaokrúhlime na celé číslo.																												

TÉMA	LIPIDY																
Úloha 11:	Stanovenie čísla zmydelnenia tukov																
Princíp:	Číslo zmydelnenia udáva počet mg hydroxidu draselného potrebného na zmydelnenie esterových väzieb a na neutralizáciu nižších mastných kyselín, ktoré vznikli oxidáciou dvojitých väzieb, v 1 g tuku. Táto hodnota je nepriamo úmerná priemernej molekulovej hmotnosti mastných kyselín v tukoch. Vyjadruje množstvo mastných kyselín v danom množstve tuku. To znamená, že keď sú molekulové hmotnosti mastných kyselín nižšie (kratšie reťazce), v jednom grame tuku ich bude viac, čo sa prejaví vyššou hodnotou čísla zmydelnenia a naopak.																
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 0,5 M etanolový roztok hydroxidu draselného 0,5 M roztok kyseliny chlorovodíkovej fenolftaleín vzorky tukov rozpustené v petroléteri (40 g/100 ml) petroléter (teplota varu 40-60 °C) 																
Materiál:	byreta s objemom 25 ml, varné banky so zábrusom s objemom 250 ml (2 ks), varné kamienky, Ramsayov tuk, guľičkový chladič, hadice na privod a odvod vody, varič, hrniec s vodou, sklenené pipety s nadstavcom																
Postup:	Do 250 ml banky napipetujeme 5 ml roztoku tuku v petroléteri, pripipetujeme 25 ml etanolového roztoku KOH a pridáme varné kamienky. Refluxujeme pod spätným chladičom 1 až 1,5 hod (kvôli nízkej teplote varu petroléтеру nastavíme varič na 1/3 maxima). Potom chladič vypláchneme 50 ml destilovanej vody (nalejeme ju zhora cez chladič po odstavení z vodného kúpeľa). Pridáme 2 – 4 kvapky fenolftaleínu a titrujeme 0,5 M HCl do odfarbenia roztoku. Slepý pokus, ktorý nerefluxujeme, pripravíme z 5 ml petroléтеру a 25 ml etanolového roztoku KOH. Tiež doň pridáme 50 ml destilovanej vody, fenolftaleín a titrujeme do odfarbenia.																
Vyhodnotenie:	<p>Zo spotrieb oboch titrácií vypočítame číslo zmydelnenia, a to podľa vzťahu:</p> $\text{číslo}_{\text{zmyd}} = \frac{(V_{SL} - V_{VZ}) \cdot 28,05}{m}$ <p>kde V_{SL} je spotreba HCl pri titrácii slepého pokusu (v ml), V_{VZ} je spotreba HCl pri titrácii vzorky (v ml), m je hmotnosť titrovanej vzorky tuku (v gramoch).</p> <table border="1"> <caption>TABUĽKA 2.6 Čísla zmydelnenia vybraných tukov*</caption> <tbody> <tr> <td>repkový olej</td> <td>182 – 193</td> <td>ľanový olej</td> <td>188 – 196</td> </tr> <tr> <td>olivový olej</td> <td>184 – 196</td> <td>bravčová masť***</td> <td>192 – 203</td> </tr> <tr> <td>arašidový olej</td> <td>187 – 196</td> <td>kravské maslo**</td> <td>210 – 232</td> </tr> <tr> <td>slničnicový olej</td> <td>188 – 194</td> <td>kokosový olej</td> <td>248 – 265</td> </tr> </tbody> </table> <p>* <i>The Lipid Handbook</i>, F. D. Gunstone, J. L. Harwood, A. J. Dijkstra, 3. vydanie, 2007, CRC Press ** https://oilpalmblog.wordpress.com/2014/08/31/quality-and-identity-characteristics-part-2-chemical-characteristics/ [citované: 21.6.2020]</p>	repkový olej	182 – 193	ľanový olej	188 – 196	olivový olej	184 – 196	bravčová masť***	192 – 203	arašidový olej	187 – 196	kravské maslo**	210 – 232	slničnicový olej	188 – 194	kokosový olej	248 – 265
repkový olej	182 – 193	ľanový olej	188 – 196														
olivový olej	184 – 196	bravčová masť***	192 – 203														
arašidový olej	187 – 196	kravské maslo**	210 – 232														
slničnicový olej	188 – 194	kokosový olej	248 – 265														
Záver:	Nami zistenú hodnotu čísla zmydelnenia vzorky tuku porovnáme s tabuľkovou hodnotou a uvedieme o aký tuk išlo. Výsledok zaokrúhlime na celé číslo.																

TÉMA	LIPIDY						
Úloha 12:	Stanovenie koncentrácie cholesterolu						
Princíp:	<p>Cholesterol patrí medzi najdôležitejšie steroly. V krvi sa transportuje v podobe lipoproteínov. V malom množstve je nevyhnutnou súčasťou organizmu, kde sa zúčastňuje na osmotických a difúzných procesoch bunky (je súčasťou biologických membrán.).</p> <p>Poruchy metabolizmu a transportu cholesterolu podporujú vznik srdcovo-cievnych ochorení. Jeho nadmerný príjem v potrave spôsobuje zúženie priesvitu (vnútorného prierezu) ciev a následné cirkulačné poruchy. Keďže sa cholesterol nachádza v živočíšnych potravinách, mal by sa ich príjem v strave obmedzovať.</p> <p>Pri Liebermann-Burchardovej reakcii sa z cholesterolu v prostredí kyseliny octovej a sírovej odštiepuje molekula vody, pričom vzniká karbóniový kation 3,5-cholestadiénu. Jeho oxidáciou v prítomnosti acetanhydridu vzniká modrozelený produkt, pentaenylový kation s absorpčným maximom 620 nm:</p>						
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. štandardný roztok cholesterolu v chloroforme s koncentráciou 1 mg/ml 2. vzorka cholesterolu s neznámou koncentráciou 3. chloroform 4. Liebermann-Burchardov roztok (0,5 ml koncentrovanej kyseliny sírovej zmiešame s 10 ml vychladeného acetanhydridu. Následne, za stáleho miešania, pridáme 5 ml ľadovej kyseliny octovej. Pripravený roztok uchováваме v chlade. Pred použitím necháme zohriať na izbovú teplotu.) 						
Materiál:	sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nastavcom, absorpčný spektrofotometer, sklenené kyvety, laboratórna trepačka						
Postup:	<p>Do šiestich označených skúmaviek pipetujeme sklenenými pipetami štandardný roztok cholesterolu (1 mg/ml) podľa tabuľky 2.7 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených. Do siedmej skúmavky pipetujeme namiesto štandardu 3 ml roztoku vzorky cholesterolu s neznámou koncentráciou (do zošita nezabudneme zapísať číslo vzorky).</p> <p>Pozor, pri stanovovaní absorbancie jednotlivých roztokov kyvetu nepremývame vodou. Používame sklenené (nie plastové!) kyvety.</p>						
TABUĽKA 2.7	0	1	2	3	4	5	vzorka
štandard cholesterolu [ml]	–	0,5	1	1,5	2	2,5	–
neznáma vzorka [ml]	–	–	–	–	–	–	3
Lieb.-Burch. roztok [ml]	2	2	2	2	2	2	2
chloroform [ml]	5	4,5	4	3,5	3	2,5	2
	zazátkovať a premiešať nechať 15 min reagovať v tme určiť absorbanciu pri 620 nm						
množstvo cholesterolu v skúmavke [mg]	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	x
absorbancia pri 620 nm	–						

Vyhodnotenie:	Pomocou kalibračných roztokov (skúmavky 1 až 5) zostrojíme kalibračný graf (závislosť absorbancie štandardného roztoku cholesterolu pri 620 nm od množstva) a z neho určíme množstvo cholesterolu v mg na 3 ml vzorky (x) . Túto hodnotu následne prepočítame na 1 ml vzorky. Stanovené množstvo cholesterolu porovnáme so skutočnou hodnotou a vypočítame relatívnu chybu (v %).
Záver:	Uvedieme koncentráciu cholesterolu vo vzorke (v mg/ml) spolu s relatívnou chybou.
Úloha 13:	Dôkaz cholesterolu: Salkowského reakcia
Princíp:	<p>Koncentrovaná kyselina sírová je značne hygroskopická a spôsobuje odštiepenie vody z molekuly cholesterolu. Pritom dochádza ku kovalentnému spojeniu dvoch molekúl cholesterolu na pozícii 3 za vzniku bi-cholestadiénu. Následne sa kyselina sírová viaže na molekulu bi-cholestadiénu na pozíciách 7 a 7', pričom sa tvorí finálny produkt, červeno sfarbená bi-sulfónová kyselina bi-cholestadiénu.</p>  <p style="text-align: center;">bi-cholestadién</p> <p style="text-align: center;">bisulfónová kyselina bi-cholestadiénu</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. živočíšny tuk 2. rastlinný olej 3. 2 % roztok cholesterolu v chloroforme 4. chloroform 5. koncentrovaná kyselina sírová
Materiál:	sada skúmaviek, stojan na skúmavky, mikropipety
Postup:	Do prvej skúmavky dáme 1 g živočíšneho tuku, do druhej 1 ml rastlinného oleja a do tretej 1 ml chloroformového roztoku cholesterolu. Do každej z nich pridáme po 4 ml chloroformu a 2 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Opatrne premiešame a necháme stáť. Pozorujeme postupnú zmenu sfarbenia reakčných zmesí, pričom horné chloroformové vrstvy majú oranžové až červené sfarbenia a spodné kyselinové vrstvy sa sfarbia na žltozeleno.
Pozorovanie:	Porovnáme a zapíšeme sfarbenia roztokov v jednotlivých skúmavkách.

TÉMA	LIPIDY
Úloha 14:	Výroba mydla
Princíp:	<p>Triacylglyceroly sa v prostredí hydroxidu sodného, príp. draselného rozkladajú na glycerol a soli mastných kyselín (mydlo). Táto reakcia sa nazýva alkalická hydrolýza alebo zmydelňovanie tukov:</p> $ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{R} \\ \\ \text{HC}-\text{O}-\text{C}-\text{R} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{R} \\ \parallel \\ \text{O} \\ \text{triacylglycerol} \end{array} + 3 \text{NaOH} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2-\text{OH} \\ \text{glycerol} \end{array} + 3 \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}^- \text{Na}^+ \\ \text{mydlo} \\ \text{(sol' mastnej kyseliny)} \end{array} $
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. etanol 2. 50 % roztok hydroxidu sodného
Materiál:	odparovacia miska, pipety, rastlinný olej, kadička s objemom 150 ml, sklenená tyčinka, lyžička
Postup:	V odparovacej miske zmiešame 2 ml rastlinného oleja a 3 ml etanolu. Opatrne pridáme 0,5 ml 50 % NaOH. Misku mierne zahrievame na vodnom kúpeli za stáleho miešania, dokiaľ nezískame pastovitú hmotu. Misku necháme vychladnúť. Pripravené mydlo preniesieme do kadičky obsahujúcej 50 ml destilovanej vody. Zmes za stáleho miešania zahrievame až do rozpustenia mydla. Roztok mydla necháme vychladnúť a použijeme ho v ďalších experimentoch.
Úloha 15:	Reakcie s mydlom
	1. Vysol'ovanie mydla
Princíp:	Po pridaní NaCl sa mydlo vylúči z roztoku. Tento postup sa roky používal na prečistenie pripravovaných mydiel. Vedľajšie reakčné produkty zmydelnenia sú rozpustnejšie v roztoku soli a zostanú vo vodnej fáze, kým mydlo z roztoku vypadne.
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. kryštalický chlorid sodný 2. mydlo pripravené v úlohe 14
Materiál:	skúmavka, stojan na skúmavky, lyžička, kadička s objemom 50 ml
Postup:	10 ml mydlového roztoku odlejeme do kadičky s objemom 50 ml. Za stáleho miešania doň po častiach pridávame pevný NaCl dovtedy, kým sa rozpúšťa (malé množstvo NaCl môže zostať na dne kadičky). Mydlo plávajúce na hladine odoberieme pomocou lyžičky a preniesieme ho do skúmavky s destilovanou vodou. Skúmavku pretrepávame do vytvorenia mydlín.
	2. Tvorba mastných kyselín
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. 6 M kyselina chlorovodíková 2. mydlo pripravené v úlohe 14
Materiál:	pipeta, skúmavka, stojan na skúmavky, filtračný papier
Postup:	Do skúmavky odlejeme 5 ml mydlového roztoku a pomaly pridávame 3 – 6 kvapiek 6 M HCl dovtedy, kým sa nevytvorí zákal.
Pozorovanie:	Zapíšeme rovnicu reakcie.

3. Tvorba mydlovej zrazeniny (žmolkov)	
Reagencie:	1. 0,2 M chlorid vápenatý 2. mydlo pripravené v úlohe 14
Materiál:	pipeta, skúmavka, stojan na skúmavky
Postup:	Do skúmavky odlejeme 5 ml mydlového roztoku a pomaly pridávame 8 – 10 kvapiek 0,2 M CaCl ₂ .
Pozorovanie:	Zapíšeme rovnicu reakcie.
4. pH roztoku mydla	
Reagencie:	1. mydlo pripravené v úlohe 14 2. komerčné mydlo 3. komerčný saponát
Materiál:	pipeta, hodinové skličko, univerzálne indikátorové papieriky pre pH 0 – 12
Postup:	Zmeriame hodnotu pH mydlového roztoku pomocou indikátorového papiera. Urobíme analogický experiment, ale namiesto mydlového roztoku použijeme roztok komerčného mydla a detergentu.
Pozorovanie:	Uvedieme získané hodnoty pH a vysvetlíme rozdiely v pH nami pripraveného mydla a komerčných detergentov.
Úloha 16: Oxidácia nenasýtených mastných kyselín	
Princíp:	<i>Nenasýtené mastné kyseliny sú veľmi citlivé na oxidáciu. Príkladom je oxidácia kyseliny ricínolejovej na kyselinu azelainovú a kyselinu 9,10,12-trihydroxystearovú:</i>
<p style="text-align: center;"> <chem>CCCCC/C=C\CCCCCCCC(=O)O</chem> $\xrightarrow{\text{KMnO}_4, T = 75 - 90\text{ }^\circ\text{C}}$ <chem>CCCCCCCC(=O)O</chem> + <chem>CCCCCCCC(=O)O</chem> (kyselina azelainová) <chem>CCCCC(O)C/C=C\CCCCCCCC(=O)O</chem> $\xrightarrow{\text{KMnO}_4, T = 0 - 5\text{ }^\circ\text{C}}$ <chem>CCCCC(O)C(O)C(O)CCCCCCCC(=O)O</chem> (kyselina 9,10,12-trihydroxystearová) </p>	
Reagencie:	1. rastlinný olej 2. 0,01 M uhličitan sodný 3. 0,0025 M manganistan draselný
Materiál:	dve skúmavky, stojan na skúmavky, automatická pipeta, varič, hrniec s vodou
Postup:	Do dvoch skúmaviek napipetujeme po 3 ml Na ₂ CO ₃ . Do prvej z nich pridáme 3 – 5 kvapiek rastlinného oleja. Obe skúmavky mierne zahrejeme v horúcom vodnom kúpeli (1 – 2 min). Po vybratí do nich po kvapkách pridávame roztok KMnO ₄ . Po pridaní kvapky KMnO ₄ do roztoku s olejom fialová farba vymizne. Koniec reakcie v skúmavke s rastlinným olejom indikuje prítomnosť hnedej zrazeniny MnO ₂ .
Pozorovanie:	Zaznamenáme a vysvetlíme farebné zmeny roztokov.

3 SACHARIDY

Všetci vdáčíme svojej existencii rastlinám a procesu odohrávajúcim sa v nich – **fotosyntéze**. V tomto procese sa oxid uhličitý a voda menia na kyslík a glukózu, fruktózu, škrob a celulózu – látky, ktoré sa nazývajú **sacharidy**:



Sacharidy (z gréckeho *sacharon* = cukor) sú z chemického hľadiska definované ako **polyhydroxyaldehydy** a **polyhydroxyketóny**, alebo zlúčeniny, ktoré môžu byť hydrolyzovateľné na tieto látky. Všetky sacharidy obsahujú prvky uhlík, vodík a kyslík približne v pomere 1:2:1. Pomer 2:1 je pomer vodíka a kyslíka vo vode, z čoho je odvodený starší názov pre sacharidy **karbohydráty** (uhl'ohydráty). Tento názov je však trochu zavádzajúci, preto by sa nemal používať. Hoci sacharidy v molekule neobsahujú vodu, väčšina uhlíkov je spojených práve s vodíkom a hydroxylovou skupinou, a tieto zložky vody môžu byť odstránené vo forme H_2O , napríklad pôsobením koncentrovanej kyseliny sírovej, pričom čierna látka – pozostatok po tejto reakcii – je uhlík.

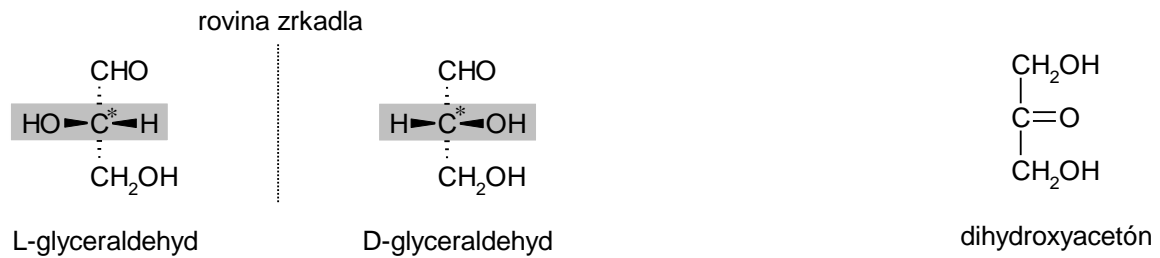
Sacharidy predstavujú väčšinu organickej hmoty na našej planéte:

- tvoria zdroj energie a metabolické medzi produkty. **Škrob** v rastlinách a **glykogén** v živočíchoch sú polysacharidy, z ktorých sa v prípade potreby môže rýchlo vytvárať **glukóza** – primárne palivo pre uvoľňovanie energie. **ATP** (adenozíntrifosfát), univerzálne zmeniteľné plavidlo voľnej energie, je fosforylovaný derivát sacharidu (**ribózy**), podobne ako mnohé koenzýmy;
- sacharidy **ribóza** a **deoxyribóza** tvoria štruktúrnu kostru RNA a DNA. Konformačná flexibilita týchto sacharidových kruhov je dôležitá pre uskladnenie a expresiu genetickej informácie;
- polysacharidy sú štruktúrnymi zložkami bunkovej steny baktérií a rastlín a tvoria skelet niektorých živočíchov. **Celulóza**, ktorá tvorí hlavnú zložku rastlinných bunkových stien, je najčastejšie sa vyskytujúcou látkou v biosfére. **Chitín** sa nachádza v bunkovej stene húb a tvorí vonkajšiu kostru článkonožcov (kôrovce, hmyz);
- sacharidy sa kovalentne viažu s mnohými lipidmi a bielkovinami (proteínmi), pričom vytvárajú **glykolipidy**, **proteoglykány** a **glykoproteíny**.

Súčasná štúdie ukazujú, že sacharidové jednotky na povrchu buniek hrajú kľúčovú úlohu pri rozpoznávaní buniek. Oplodnenie vajíčka začína naviazaním spermie na špecifický oligosacharid na povrchu vajíčka. Adhúzia lymfocytov na miesta poškodených ciev a ich návrat do lymfatických uzlín je iným príkladom dôležitej úlohy sacharidov v rozpoznávacích procesoch. Sacharidy sú zaujímavé molekuly – bohaté na informáciu, ktorá sa využíva (nám neznámym spôsobom) pri vývoji a opravách organizmov.

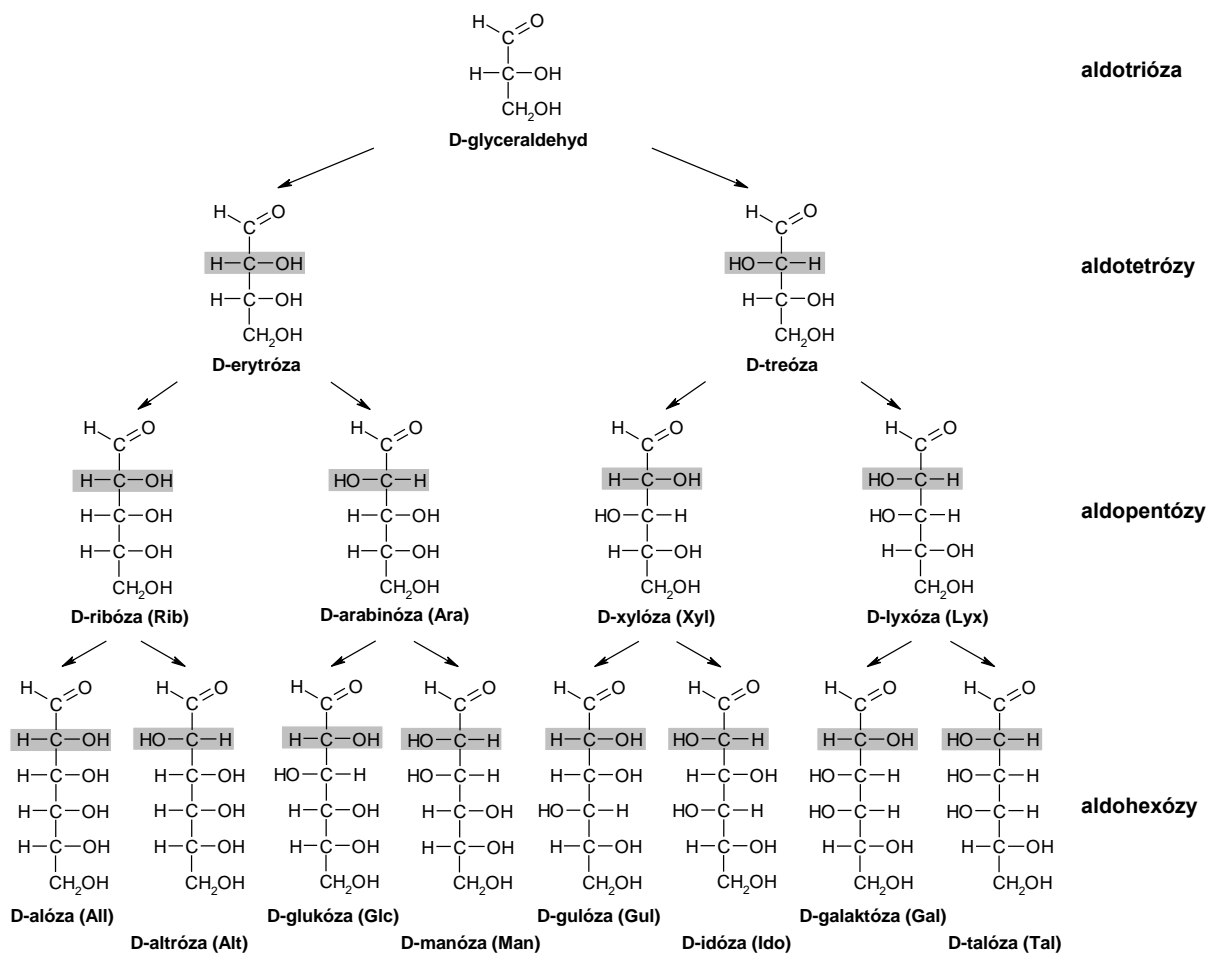
Monosacharidy

Monosacharidy patria medzi najjednoduchšie sacharidy. Ide o aldehydy alebo ketóny, ktoré obsahujú 2 a viac hydroxylových skupín. Empirický vzorec mnohých monosacharidov je $(\text{CH}_2\text{O})_m$. Podľa funkčnej skupiny ich delíme na **aldózy** (funkčná skupina $-\text{CHO}$) a **ketózy** (funkčná skupina $\text{C}=\text{O}$). Najjednoduchšie sú tie s tromi uhlíkmi (**triózy**, $m = 3$), a to **glycerinaldehyd** (aldóza) a **dihydroxyacetón** (ketóza):

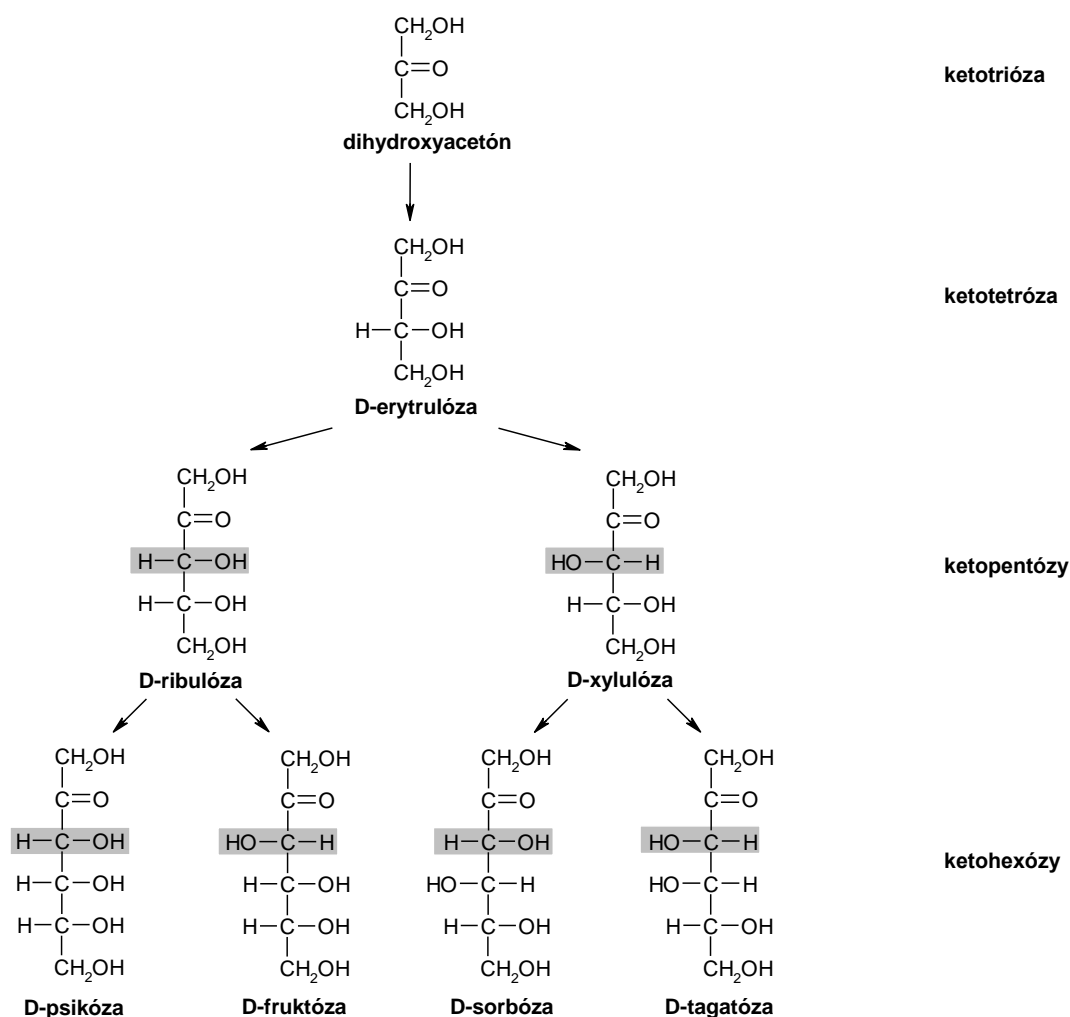


Glyceraldehyd má jediný asymetrický uhlík (C^{*}). Preto existujú dva stereoizoméry: D-glyceraldehyd a L-glyceraldehyd. Predpony D a L označujú absolútnu konfiguráciu. Pripomíname, že vo Fischerovej projekcii molekuly, atómy spojené s asymetrickým uhlíkom horizontálnymi väzbami ležia pred rovinou stránky papiera a atómy spojené vertikálnymi väzbami ležia za touto rovinou.

Sacharidy so štyrmi, piatimi, šiestimi a siedmimi uhlíkovými atómami sa nazývajú **tetrózy**, **pentózy**, **hexózy** a **heptózy** (obrázok 3.1A, B). Dve najbežnejšie hexózy sú **D-glukóza** (aldóza) a **D-fruktóza** (ketóza). Pre sacharidy s viac ako jedným asymetrickým uhlíkovým atómom symboly D a L poukazujú na absolútnu konfiguráciu asymetrického uhlíka, ktorý je najvzdialenejší od aldehydovej alebo keto- skupiny. Tieto hexózy patria do D radu, pretože ich konfigurácia na piatom uhlíku (C-5, posledný asymetrický uhlík vo vzorci) je rovnaká ako má D-glyceraldehyd.

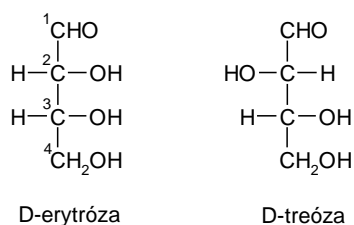


Obrázok 3.1A Prehľad D-aldóz.



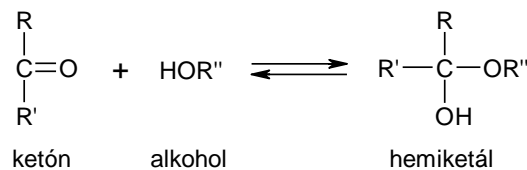
Obrázok 3.1B Prehľad D-ketóz.

Vo všeobecnosti má molekula s n asymetrickými centrami bez prítomnosti roviny symetrie 2^n stereoizomerných foriem. Pre aldotriózy $n = 1$, preto poznáme 2 stereoizoméry: D- a L-glyceraldehyd. Tieto formy sa tiež nazývajú **enantiómami** – **zrkadlovými obrazmi** (pre ne je charakteristické to, že otáčajú rovinu polarizovaného svetla o ten istý uhol v opačnom smere). Pridaním HCOH skupiny vznikajú štyri aldotetriózy, pretože $n = 2$. Dve z nich sú D-sacharidy, dve sú enantioméne L-sacharidy. Pozrime sa bližšie na D-sacharidy:

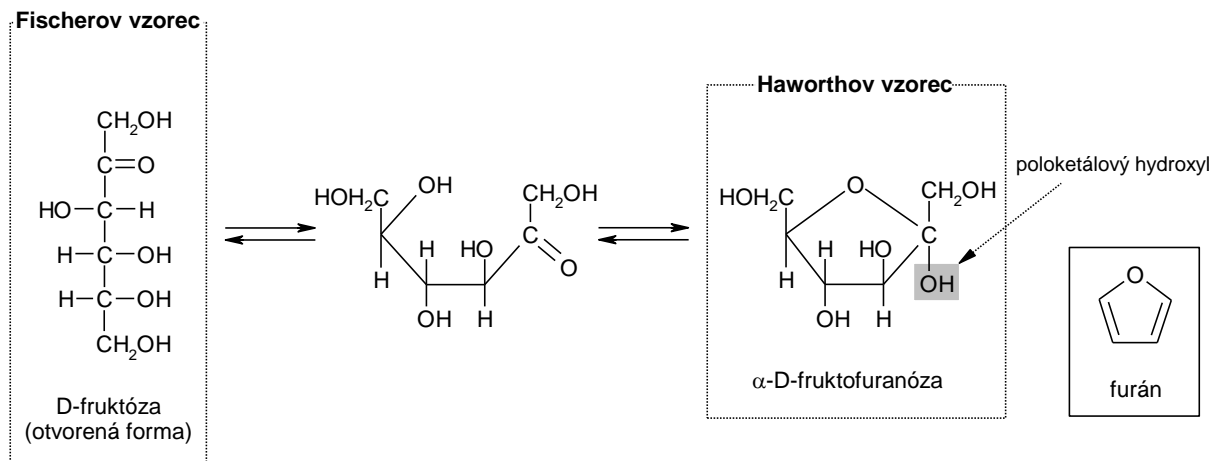


Obidve D-aldotetriózy majú rovnakú konfiguráciu na C-3 (podľa definície D a L radu), ale opačnú na C-2 – nazývajú sa **diastereoizoméry**, nie enantioméry (!), pretože nie sú navzájom zrkadlovými obrazmi.

Podobne ketón môže reagovať s alkoholom za vzniku **hemiketálu** (poloketálu):

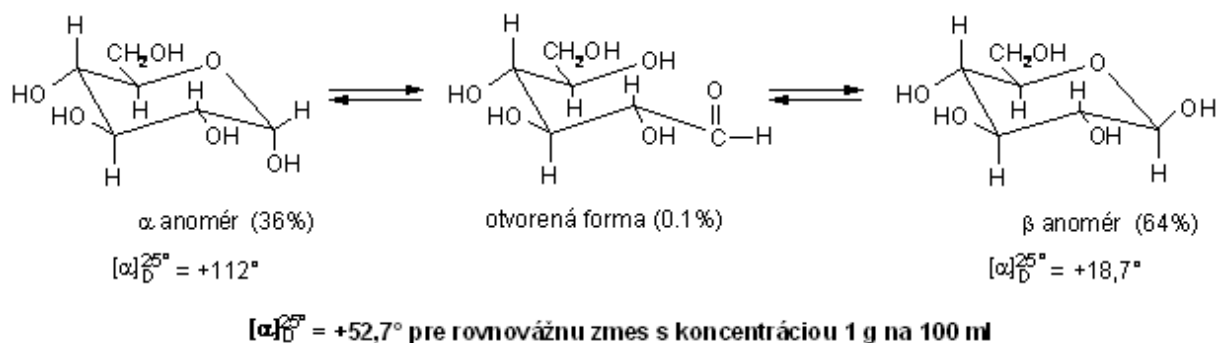


Uhlík C-2 keto skupiny v otvorenej forme fruktózy môže reagovať s C-5 hydroxylovou skupinou za vzniku **intramolekulového hemiketálu**. Tento 5-článkový kruh sa nazýva furanóza, pretože je podobný furánu:



Uzavreté štruktúry D-glukózy môžu tvoriť **α-D-glukopyranózu** a **β-D-glukopyranózu**. Pre **D-aldózy** v Haworthovej projekcii označenie **α** znamená, že **hemiacetálová hydroxylová skupina na C-1 je pod** rovinou kruhu; označenie **β** znamená, že **hemiacetálová hydroxylová skupina na C-1 je nad** rovinou kruhu. Uhlík C-1 sa tiež nazýva **anomérny uhlíkový atóm** (v dôsledku uzavretia kruhu je aj tento uhlík asymetrický) a formy **α** a **β** sú **anoméry**. Vo všeobecnosti pri písaní Haworthových vzorcov D-sacharidov platí, že hydroxylové skupiny, ktoré sú vo Fischerovom vzorci napravo budú pod rovinou kruhu, a tie, ktoré sú naľavo budú nad rovinou kruhu.

Vo vode prechádza α-D-glukopyranóza na β-D-glukopyranózu a naopak, a to cez otvorenú formu až do vytvorenia rovnováhy medzi oboma cyklickými formami. Táto premena bola dávno sledovaná vďaka meraniu optickej otáčavosti a samotný proces sa nazýva **mutarotácia**.



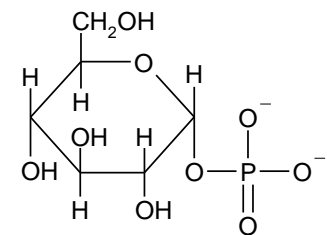
Rovnovážna zmes obsahuje približne jednu tretinu α -anoméru, dve tretiny β -anoméru a minimálne množstvo ($< 1\%$) otvorenej formy. Niektoré bunky obsahujú enzýmy **mutarotázy**, ktoré urýchľujú premenu anomérnych sacharidov.

V prítomnosti oxidačných činidiel, kovových iónov ako Cu^{2+} a určitých enzýmov, monosacharidy podliehajú **oxidačným reakciám**. Oxidáciou aldehydovej skupiny aldóz vznikajú **aldónové kyseliny**. Pri oxidácii koncovej $-\text{CH}_2\text{OH}$ skupiny (primárna alkoholová skupina) sa tvoria **urónové kyseliny**. Výsledkom oxidácie oboch uvedených skupín sú **aldárové kyseliny**. Na to, aby došlo k oxidačnej reakcii je nutné, aby sacharid obsahoval voľný poloacetálový hydroxyl, ktorý je na C-1. Tým sa zabezpečí to, aby mohol sacharid voľne prechádzať z cyklickej formy na otvorenú formu, ktorá je potrebná na prebehnutie oxidačnej reakcie. Takým sacharidom hovoríme, že sú **redukujúce (samé sa oxidujú)**. **Všetky monosacharidy sú redukujúce**, čo sa využíva na ich dôkaz (viď dôkazové reakcie sacharidov).

Redukciou aldehydovej a keto-skupiny monosacharidov vznikajú **sacharidové alkoholy (alditoly)**. Alditoly sa komerčne využívajú pri spracovaní potravín a liekov. Redukciou D-glukózy sa tvorí **D-glucitol** známy aj ako **D-sorbitol**.

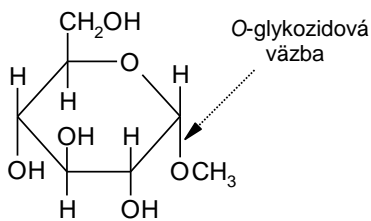
Pre monosacharidy sú charakteristické **izomerizačné reakcie**. Ako príklad možno uviesť alkalický roztok D-glukózy, ktorý po niekoľkých hodinách bude obsahovať aj D-manózu a D-fruktózu ako dôsledok izomerizačných reakcií. Obe izomerizácie zahŕňajú súčasne intramolekulový presun vodíkového atómu a prechodnú zmenu polohy dvojitej väzby. Vratná transformácia glukózy na fruktózu je príkladom aldózo-ketózovej konverzie. Premena glukózy na manózu sa nazýva **epimerizácia**, keďže ide o zmenu konfigurácie na jednom asymetrickom uhlíku.

Reakciou hydroxylových skupín sacharidov s kyselinami vznikajú sacharidové estery. **Esterifikácia** často dramaticky mení fyzikálne a chemické vlastnosti sacharidov. V prírode sa najčastejšie vyskytujú fosfátové a sulfátové estery. Fosforylované deriváty určitých monosacharidov sú dôležitými metabolickými zložkami buniek. Sulfátové estery sú súčasťou proteoglykánov vyskytujúcich sa v spojivovom tkanive.



α -D-glukóza-1-fosfát

Pri zahrievaní glukózy s bezvodým metanolom obsahujúcim HCl, reaguje anomérny uhlíkový atóm s hydroxylovou skupinou metanolu za vzniku dvoch acetálov: metyl α -D-glukopyranozidu a metyl β -D-glukopyranozidu. Kyselina uľahčuje odstránenie $-\text{OH}$ skupiny vďaka protonizácii anomérneho uhlíkového atómu. Nová väzba medzi C-1 glukózy a kyslíkovým atómom metanolu sa nazýva **glykozidová väzba** – v danom prípade **O-glykozidová väzba** (poznáme aj **N-glykozidovú väzbu**). Sacharidy sa navzájom spájajú **O-glykozidovou väzbou** za vzniku disacharidov a polysacharidov.



metyl α -D-glukopyranozid

Disacharidy

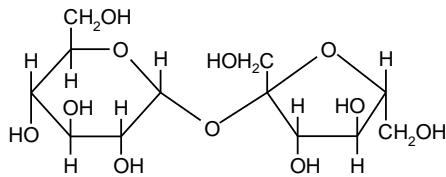
Disacharidy pozostávajú z dvoch monosacharidov spojených **O-glykozidovou väzbou**. Tri najčastejšie sa vyskytujúce disacharidy sú **sacharóza**, **laktóza** a **maltóza**. Je zaujímavé spomenúť aj **trehalózu** – disacharid s pozoruhodnými stabilizujúcimi účinkami na biomakromolekuly, často sa vyskytujúci/syntetizovaný v organizmoch v stresových podmienkach.

Sacharóza sa komerčne získava z cukrovej trstiny a repy. Anomérny uhlíkový atóm na glukózovej jednotke a fruktózovej jednotke sú spojené a vytvárajú glykozidovú väzbu disacharidu. Konfigurácia tejto glykozidovej väzby je α pre D-glukózu a β pre D-fruktózu – z toho vyplýva aj systémový názov sacharózy: **α -D-glukopyranozyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fruktofura-**

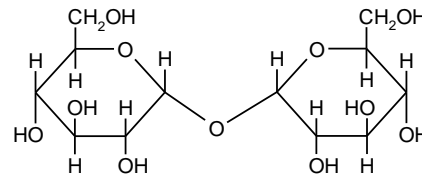
nozid. Keďže na vzniku glykozidovej väzby sa podieľa poloacetálový hydroxyl D-glukózy a poloketálový hydroxyl D-fruktózy, **sacharóza stráca redukčné vlastnosti**, na rozdiel od väčšiny ostatných sacharidov. Redukčné vlastnosti nemá ani **trehalóza – α -D-glukopyranozyl-(1 \rightarrow 1)- α -D-glukopyranozid**.

Laktóza – mliečny cukor, pozostáva z β -D-galaktopyranózy sporej s β -D-glukopyranózou β -1,4-glykozidovou väzbou (**β -D-galaktopyranozyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopyranóza**). Je to redukujúci disacharid.

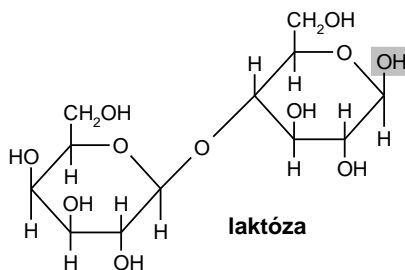
Maltóza – sladový cukor, získava sa hydrolýzou škrobu. Tento disacharid je zložený z dvoch glukózových jednotiek spojených α -1,4-glykozidovou väzbou (**α -D-glukopyranozyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glukopyranóza**). Podobne ako laktóza, aj maltóza je redukujúci disacharid.



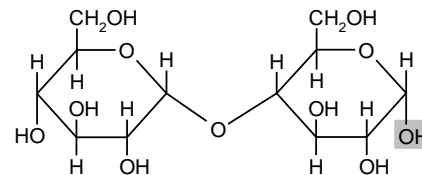
sacharóza



trehalóza



laktóza



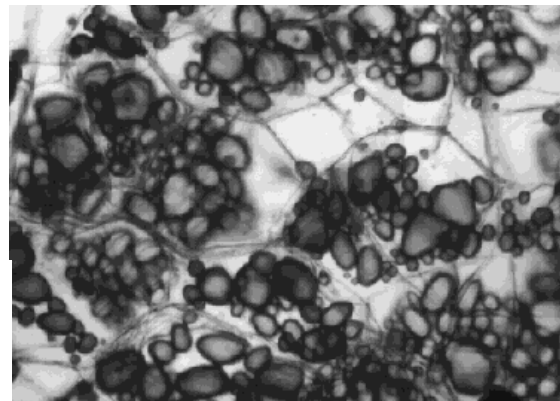
maltóza

* šedou farbou je zvýraznený voľný poloacetálový hydroxyl

Polysacharidy

Živočíšne bunky skladujú glukózu vo forme **glykogénu**. Glykogén tvorí veľké, rozvetvené polymérne štruktúry, pozostávajúce z glukózových jednotiek. Väčšina glukózových jednotiek v glykogéne je spojená α -1,4-glykozidovou väzbou. Rozvetvenia sú tvorené α -1,6-glykozidovou väzbou, ktorá sa vyskytuje približne po každých 10 jednotkách glukózy. Tieto vetvenia zvyšujú rozpustnosť glykogénu a zvyšujú prístupnosť glukózových jednotiek.

Zásobným zdrojom energie v rastlinách je **škrob**, ktorý je zložený z dvoch foriem, a to amylózy a amylopektínu. **Amylóza** (20 % škrobu, rozpustná v horúcej vode), nerozvetvený typ škrobu, pozostáva z glukózových jednotiek pospájaných α -1,4-glykozidovou väzbou. **Amylopektín** (80 % škrobu, nerozpustný vo vode), rozvetvená forma, vytvára α -1,6-glykozidovú väzbu po každých cca 30 glukózových jednotkách (spojených α -1,4-glykozidovou väzbou) – teda podobne ako glykogén, ale s nižším stup-

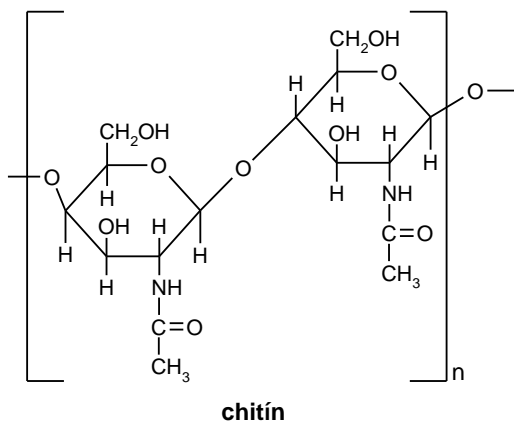


Obrázok 3.2 Škrob tvorí nerozpustné zrná v rastlinných bunkách. Obrázok ukazuje tieto škrobové zrná (jemne zafarbené jódom) v bunkách zemiaku. Ryža, zrna a kukurica sú taktiež bohatými zdrojmi škrobu.

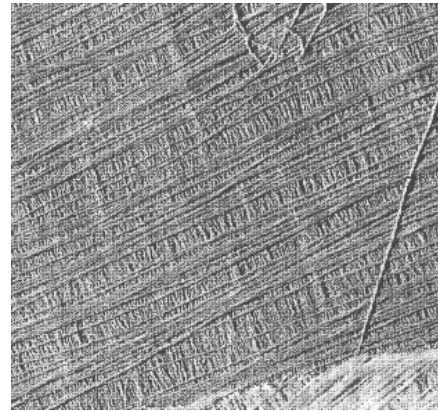
ňom rozvetvenia. Viac ako polovica sacharidov v našej potrave pozostáva zo škrobu. Obidve formy – amylopektín a amyulóza – sú rýchlo hydrolyzovateľné α -amylázou, ktorá je vylučovaná slinnými žľazami a pankreasom. α -amyláza je endoglykozidáza, ktorá hydrolyzuje α -1,4 väzby za vzniku maltózy, maltotriózy a α -dextrínu.

Celulóza je hlavnou zložkou dreva a rastlinných vlákien – má predovšetkým štruktúrnú úlohu. Celulóza je jednou z najhojnejších zložiek v biosfére. Ročne sa syntetizuje a degraduje približne 10^{15} kg tejto látky! Je to nerozvetvený polymér pozostávajúci z jednotiek glukózy spojených β -1,4-glykozidovou väzbou. β konfigurácia umožňuje celulóze vytvárať dlhé rovné reťazce. α -1,4-glykozidová väzba v glykogéne a škrobe má za následok veľmi rozdielnú molekulovú architektúru. Na rozdiel od celulózy, glykogén a škrob vytvárajú helikálne (špirálové) štruktúry. α a β konfigurácia glykozidovej väzby má dôležité biologické dôsledky. Rovný reťazec tvorený β -väzbou je optimálny na konštrukciu vlákien s veľkou ťahovou odolnosťou. Naopak, otvorený helix tvorený α -glykozidovou väzbou je vhodný na tvorbu prístupného zdroja energie.

Chitín sa nachádza v organizme mnohých bezstavovcov – hlavne hmyzu. Nachádza sa aj v niektorých hubách a morských živočíchoch, ako napr. v kraboch. Chitín je prírodným fibrínom, je netoxický a nemá vedľajšie účinky. Jeho štruktúra je veľmi podobná celulóze, pretože chitín obsahuje **N-acetyl-glukozamínové zvyšky**, ktoré sú navzájom pospájané β -1,4-glykozidovými väzbami. Táto látka sa od celulózy odlišuje tým,



že každá hydroxylová skupina na druhom uhlíku glukózy je nahradená acetamidovou skupinou. Chitín sa nerozpúšťa v alkohole, slabých kyselinách ani zásadách. Tráviace enzýmy živočíchov ho nedokážu rozštiepiť. Pri niektorých potravinárskych technológiach (spracovanie morských krabov) sa získava veľa odpadového chitínu, ktorý sa môže využiť ako substrát na čistenie odpadových vôd, pri liečení popálenín i hojení rán. Bunkovú stenu buniek húb tvorí tiež prevažne chitín, ktorý sa však nevyskytuje v bunkách vyšších rastlín.

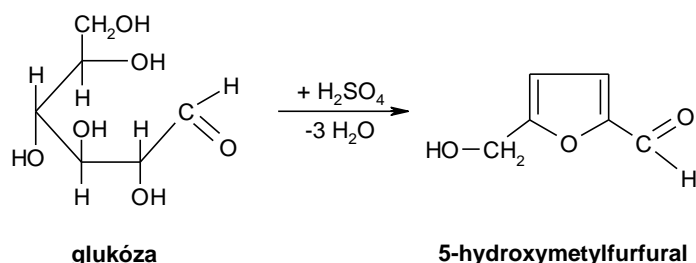
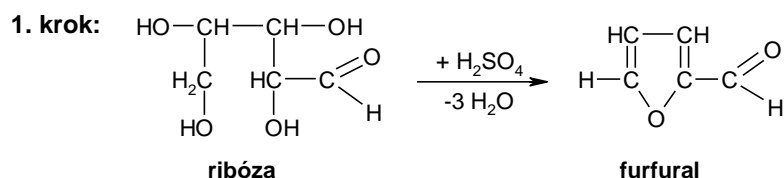


Obrázok 3.3 Tento elektrónový mikrograf ukazuje celulózo­vé vlákna v bunkových stenách zelených rias.

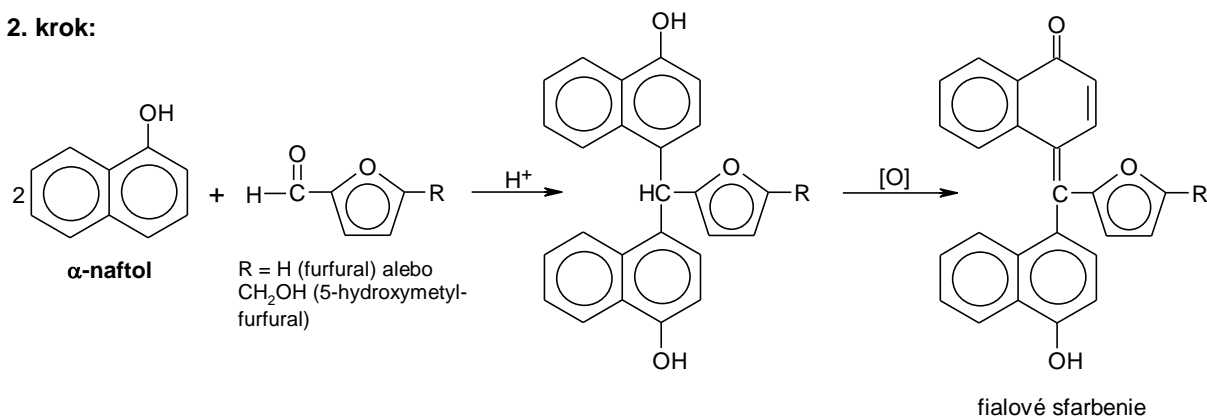
DÔKAZOVÉ REAKCIE SACHARIDOV

Molischova reakcia

Molischova reakcia je všeobecný test na **všetky** monosacharidy, ktoré obsahujú päť a šesť atómov uhlíka. Test je založený na schopnosti monosacharidov podstupovať kyselinou katalyzovanú dehydratáciu za vzniku aldehydu. V prvom kroku sa účinkom koncentrovanej kyseliny sírovej tvorí z pentóz **furfural** a z hexóz **5-hydroxymetylfurfural**:



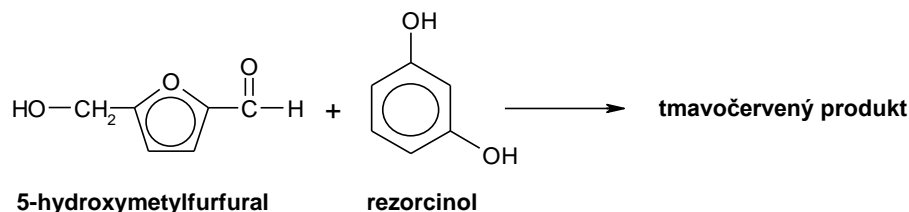
V druhom kroku kondenzuje furfural, resp. 5-hydroxymetylfurfural s dvoma molekulami α -naftolu (Molischovo činidlo), pričom vzniká fialovo sfarbený produkt:



Rovnako aj disacharidy a polysacharidy dávajú pozitívny výsledok, keď sú hydrolyzované kyselinou na 5- a 6-uhlíkové monosacharidy.

Seliwanovova reakcia

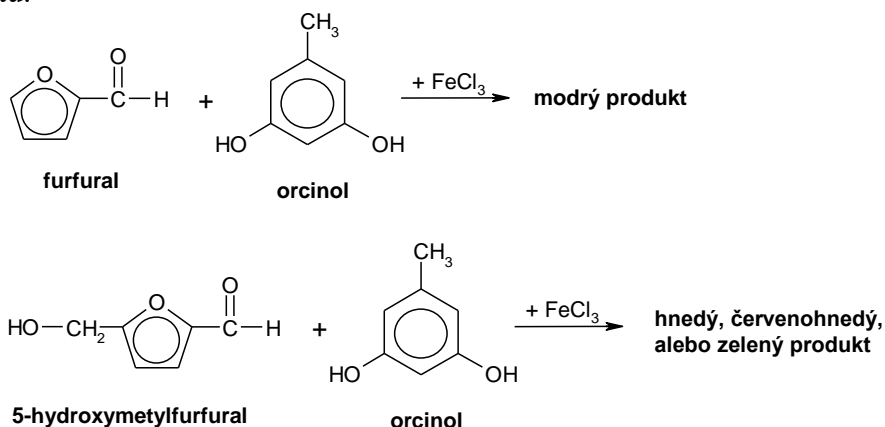
Seliwanovova reakcia rozlišuje **ketohexózy** od **aldohexóz**. Ketohexózy dehydratujú rýchlo za vzniku 5-hydroxymetylfurfuralu, zatiaľ čo aldohexózy dehydratujú oveľa pomalšie. 5-hydroxymetylfurfural reaguje s **rezorcinolom** za vzniku tmavočerveného kondenzačného produktu:



Bialova reakcia

Bialova reakcia odlišuje **5-uhlíkové** monosacharidy od **6-uhlíkových**. Furfural vznikajúci dehydratáciou **5-uhlíkového** sacharidu reaguje s **orcinolom** a chloridom železitým za vzniku

modrého kondenzačného produktu. **5-hydroxymetylfurfural** vznikajúci dehydratáciou **6-uhlíkového** sacharidu reaguje za vzniku hnedého, červenohnedého alebo zeleného kondenzačného produktu:



Disacharidy a polysacharidy budú dávať pozitívny výsledok po kyslej hydrolyze.

Rothenfusserova reakcia

Difenylamín dáva pri reakcii s **ketózami** v prostredí minerálnej kyseliny intenzívne **modré** sfarbenie.

Reakcia s floroglucínom (podľa Tollensa)

Pentózy v kyslom prostredí za varu odštiepujú vodu, pričom sa tvorí furfural. Dokazujeme ho roztokom **floroglucínu**, pričom vzniká **purpurovočervené** sfarbenie.

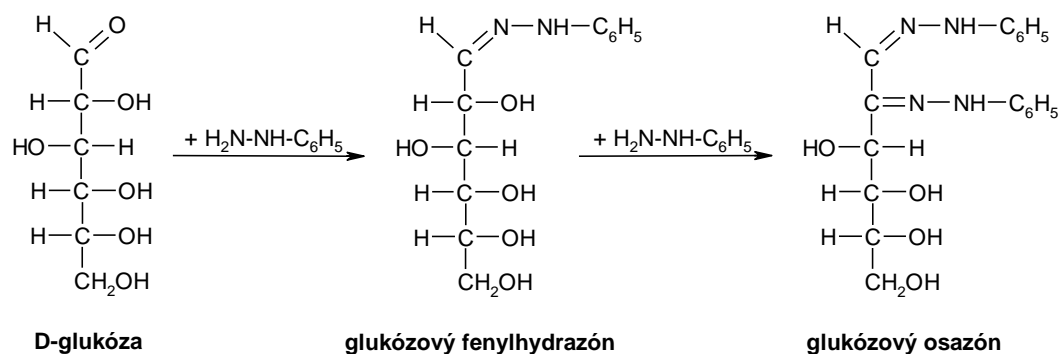
Fouglerov test

V prítomnosti Fouglerovho činidla (močovina + H₂SO₄ + SnCl₂) po zahriatí dáva:

- **fruktóza** – **zelenomodré** zafarbenie,
- **aldohexózy** – **červené až purpurové** sfarbenie,
- **aldopentózy** – **žlté** sfarbenie.

Tvorba osazónov

Aldózy a **ketózy** kondenzujú s **fenylhydrazínom** v prostredí kyseliny octovej na príslušné **hydrazóny**, ktoré kondenzujú s ďalšou molekulou fenylhydrazínu na tzv. **osazóny**:



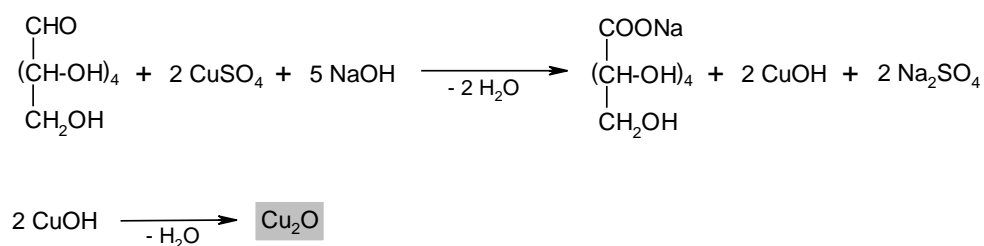
Osazóny sú žlté, dobre kryštalizujúce látky, preto sa používajú na identifikáciu sacharidov. Kryštály glukosazónu majú charakteristický tvar dlhých ihlíc, spojených do tvaru hviezdíc.

Redukčné skúšky

Povarením mono- a disacharidov, obsahujúcich voľnú poloacetálovú hydroxyskupinu v silno alkalickom prostredí vznikajú ako medziprodukty tzv. **reduktóny**, ktoré redukujú komplexne viazané ióny ťažkých kovov (Cu^{2+} , Bi^{3+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Ag^+) a niektoré iné látky (kyselinu pikrovú, metylénovú modrú).

Trommerova reakcia

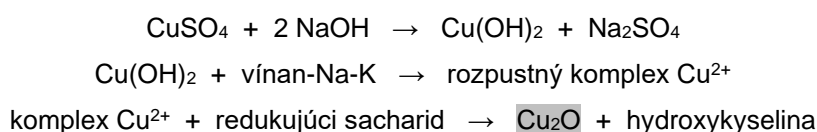
Hexózy redukujú Cu^{2+} v alkalickom prostredí na Cu^+ . Ako komplexotvorné činidlo účinkuje sám sacharid:



Reakcia prebieha za vzniku zrazeniny $\text{Cu}(\text{OH})_2$, ktorá sa pri zatrepaní skúmavkou rozpustí a zafarbí roztok na intenzívne modro. Pri zahrievaní skúmavky do varu spočiatku vzniká žltá zrazenina CuOH , ktorá postupne vznikom Cu_2O sčervenie.

Reakcia s Fehlingovým činidlom

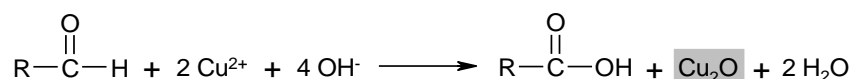
Princíp Fehlingovej reakcie je podobný ako pri Trommerovej reakcii, s tým rozdielom, že ako komplexotvorné činidlo sa používa Seignettova soľ (vínan sodnodraselný). Zakladá sa na reakciách:



Reakcia má tú nevýhodu, že Fehlingovo činidlo je nestále. Činidlo treba preto pripravovať v skúmavke vždy čerstvé. Pri vare sacharidu s Fehlingovým činidlom sa vylúči **žltočervená** zrazenina Cu_2O a súčasne sa mení modré sfarbenie roztoku do **zelena, zelenožltá až žltozelena**, približne podľa obsahu glukózy. **Táto reakcia nie je špecifická!** Zmena sfarbenia bez vzniku zrazeniny, modrozelený alebo olivovozelený zákal, nie sú dôkazom glukózy. Tieto zmeny spôsobujú aj iné redukujúce látky.

Benediktiho reakcia

Benediktiho skúška určuje, či monosacharidy alebo disacharidy obsahujú voľnú aldehydovú skupinu, ktorá môže byť oxidovaná na karboxylovú kyselinu. Sacharid následne oxiduje meďnaté ióny v Benediktiho reagensii na červený precipitát oxidu meďného:



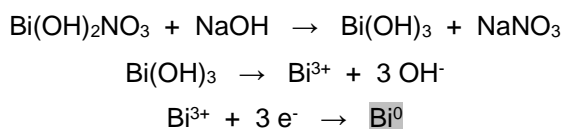
Po povarení a ochladení vznikne modrý, červený, zelený, alebo žltý precipitát podľa množstva redukujúceho sacharidu. Negatívna je táto skúška len vtedy, ak roztok zostáva číry.

Barfoedova reakcia

Barfoedova skúška je podobná ako Benediktiho, avšak rozlišuje, či redukujúci sacharid je monosacharid alebo disacharid. Barfoedova reagensia reaguje s monosacharidom za vzniku oxidu meďného oveľa rýchlejšie ako v prípade disacharidu.

Reakcia podľa Nylandera s Bi^{3+}

Princíp dôkazu redukujúcich sacharidov podľa Nylandera spočíva v redukcii Bi^{3+} na kovový bizmut, ktorý je **čierny**:

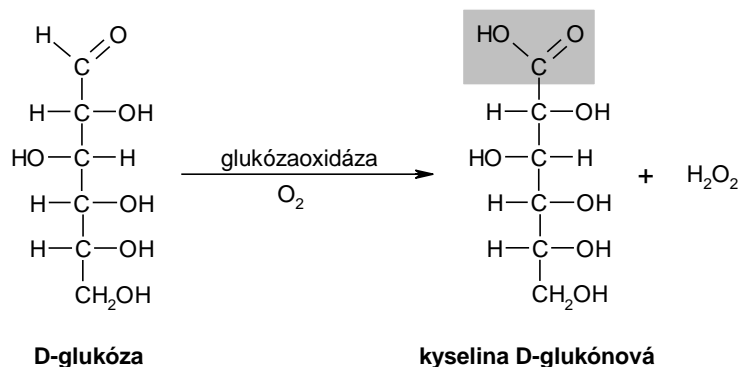


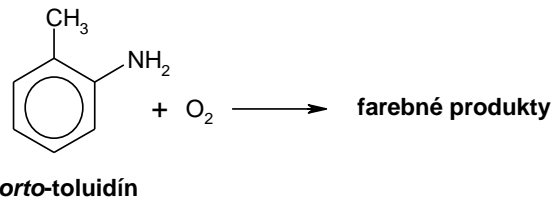
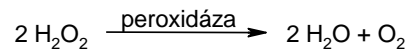
Jódový test

Niektoré sacharidy (škrob, glykogén) reagujú s jódom za vzniku charakteristickej **modrej**, v niektorých prípadoch hnedej, príp. červenej až purpurovej farby. Farebný produkt vzniká pravdepodobne v dôsledku zachytenia jódu do otvorených priestorov vnútri štruktúr, vytvorených polysacharidmi.

Test na glukózu

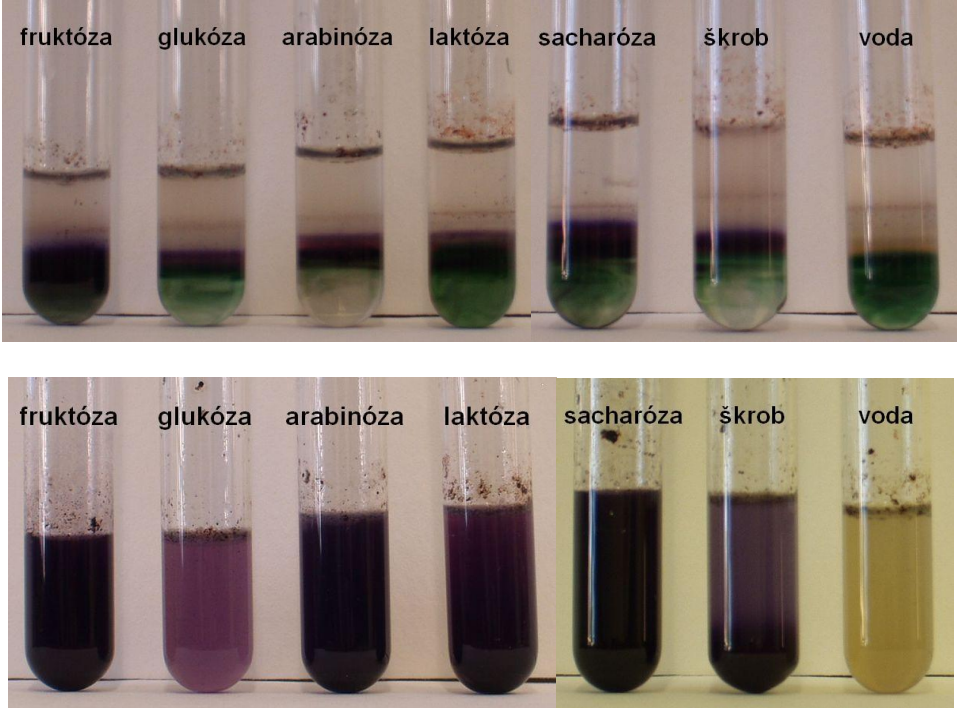
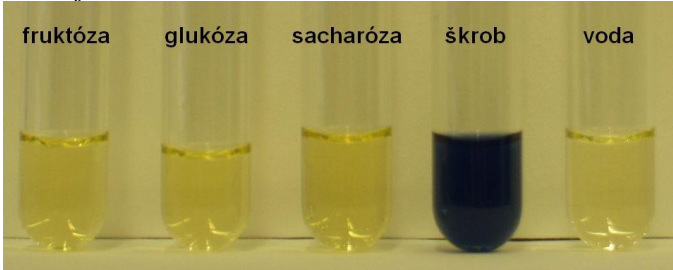
Jednoduchý, komerčne dostupný test na glukózu je založený na enzymatickej reakcii. Obsahuje *orto*-toluidín a enzýmy glukózaoxidázu a peroxidázu. Glukózaoxidáza oxiduje glukózu za vzniku glukónovej kyseliny a peroxidu vodíka. Následne, peroxid vodíka reaguje s peroxidázou za vzniku kyslíka, ktorý oxiduje *orto*-toluidín. Táto reakcia dáva produkt, ktorého farba môže byť od svetlozelenej do modročiernej.

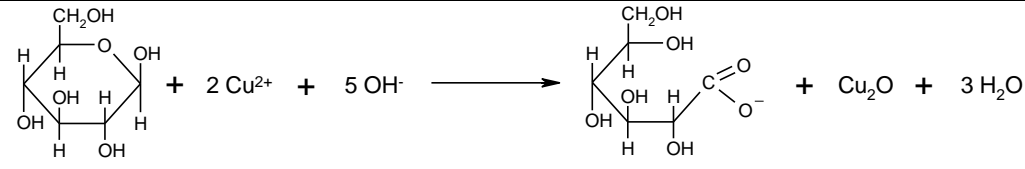

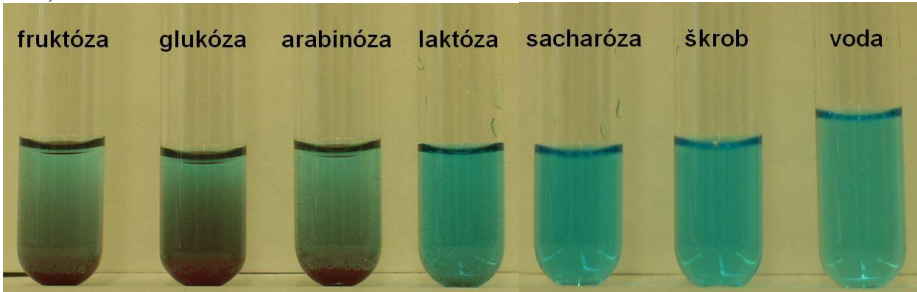
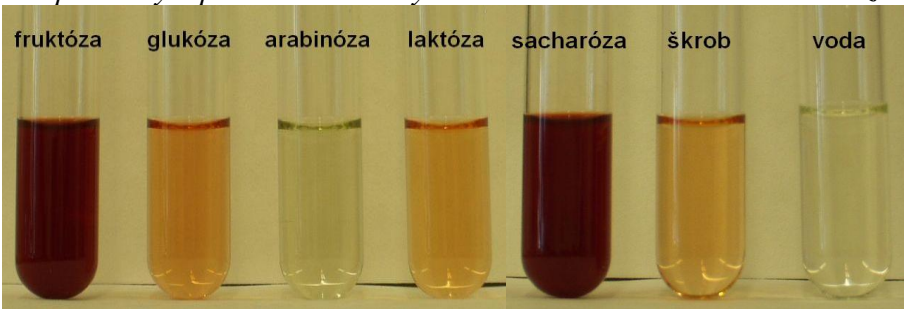


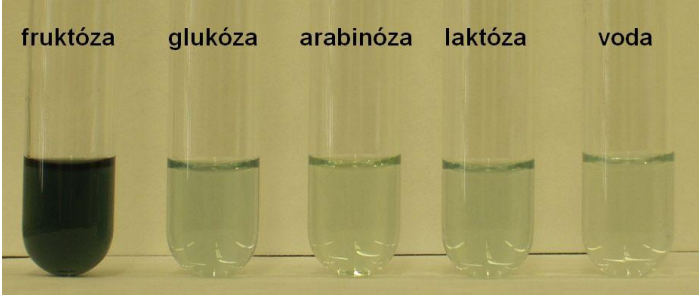
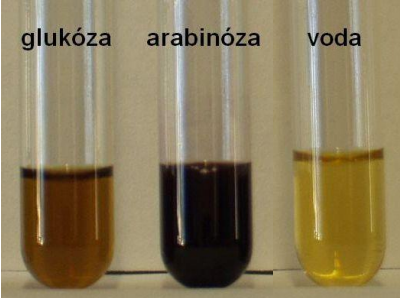


Použitá literatúra

- Barna K., Paščenko A. Je., Barnová E., Guzy J.: Lekárska chémia a biochémia, 3. prepracované vydanie, Košice 1989.
- Eaton D. C.: Laboratory investigations in organic chemistry, McGraw-Hill, Inc., New York 1989.
- Podhradský D., Mihalovová H.: Praktické cvičenia z biochémie, Košice 1989.
- Stryer L.: Biochemistry, 8th edition, W.H. Freeman and Company, New York 2015.

TÉMA	SACHARIDY
Úloha 17:	Reakcie na dôkaz sacharidov
Princíp:	<p>1. Molischova reakcia</p> <p>Sacharidy dávajú s koncentrovanou kyselinou sírovou a α-naftolom intenzívne fialové sfarbenie, ktoré je spôsobené vznikom trifenylmetánového farbiva (obrázok 3.4, horná časť pred zamiešaním, dolná časť po zamiešaní).</p>  <p>Obrázok 3.4 Molischova reakcia (nešpecifická reakcia na sacharidy)</p>
	<p>2. Jódový test</p> <p>Roztok jódu (jód rozpustený vo vodnom roztoku jodidu draselného) sa často využíva na dôkaz škrobu. Amylóza (nerozvetvená časť škrobu) vytvára helixy (závitnice), v ktorých sa zhromažďuje jód, čím vzniká charakteristické tmavomodré sfarbenie (obrázok 3.5). Amylopektín (rozvetvená časť škrobu) tvorí oveľa kratšie helixy, v ktorých sa jód nemôže zhromaždiť v dostatočnej miere, výsledkom čoho je oranžová farba roztoku. Roztok jódu reaguje aj s glykogénom za vzniku hnedého sfarbenia.</p>  <p>Obrázok 3.5 Jódový test</p>
Princíp:	<p>3. Benediktiho reakcia</p> <p>Benediktiho reakciou sa dokazujú redukujúce sacharidy (napr. glukóza, fruktóza, maltóza, laktóza). Benediktiho činidlo obsahuje síran meďnatý, ktorý sa redukuje na oxid meďný:</p>

	<div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: center;">β-D-glukopyranóza D-glukonát</p> <p><i>Oxid meďný je vo vode nerozpustný, preto ho možno pozorovať vo forme červenej, príp. oranžovej zrazeniny (obrázok 3.6). Zelenomodré sfarbenie je možné pozorovať v prípade škrobu, ktorého makromolekuly obsahujú jeden redukujúci koniec.</i></p> <div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: center;">Obrázok 3.6 <i>Benediktiho reakcia</i></p>
4. Barfoedova reakcia	
<p>Princíp:</p>	<p><i>Octan meďnatý sa v prostredí kyseliny octovej v prítomnosti redukujúcich sacharidov redukuje na oxid meďný (obrázok 3.7). Prednostne reagujú mono-sacharidy, redukujúce disachradidy až po dlhšom zahrievaní. Citlivosť reakcie sa dá zvýšiť, ak sa vzniknutým oxidom meďným redukuje kyselina arzénomolybdénová (súčasť Nelsonovho činidla) na molybdénovú modrú (nie je ukázané).</i></p> <div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: center;">Obrázok 3.7 <i>Barfoedova reakcia</i></p>
5. Seliwanovova reakcia	
<p>Princíp:</p>	<p><i>Seliwanovova reakcia je založená na vzniku višňovočerveného sfarbenia, ktoré dáva 5-hydroxymetylfurfural s rezorcínom v prítomnosti kyseliny chlorovodíkovej. Reakciu je možné použiť na odlišenie ketóz od aldóz. Farebné produkty v prítomnosti rôznych sacharidov sú uvedené na obrázku 3.8.</i></p> <div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: center;">Obrázok 3.8 <i>Seliwanovova reakcia</i></p>

	6. Rothenfusserova reakcia
Princíp:	<p>Difenylamín dáva pri reakcii s ketózami v prostredí minerálnej kyseliny intenzívne modré sfarbenie.</p> <p>Pozitívna reakcia na fruktózu je znázornená na obrázku 3.9.</p>
	
	Obrázok 3.9 Rothenfusserova reakcia
	7. Reakcia s floroglucínom
Princíp:	<p>Pentózy v kyslom prostredí varom odštiepujú vodu, pričom sa tvorí furfural. Dokazujeme ho roztokom floroglucínu, pričom vzniká purpurovočervené až bordové sfarbenie (obrázok 3.10).</p>
	
	Obrázok 3.10 Reakcia s floroglucínom
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1 % roztoky sacharidov (fruktóza, glukóza, arabinóza, laktóza, sacharóza, škrob) Molischovo činidlo (10 % roztok α-naftolu v 96 % etanole) koncentrovaná kyselina sírová 0,3 % roztok jódu v 5 % jodide draselnom Benediktovo činidlo (100 g Na_2CO_3 a 173 g citrátu 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 1 dm³.) Barfoedovo činidlo (13,3 g neutr. kryšt. octanu meďnatého rozpustíme v 200 ml vody, prefiltrujeme a pridáme 1,8 ml ľadovej kyseliny octovej.) Seliwanovovo činidlo (0,05 % roztok rezorcínu v koncentrovanej kyseline chlorovodíkovej zriedený destilovanou vodou v pomere 1:1.) Rothenfusserovo činidlo (20 ml 10 % difenylamínu v 96 % etanole, 80 ml ľadovej kyseliny octovej, 100 ml konc. kyseliny chlorovodíkovej) 0,2 % roztok floroglucínu v konc. kyseline chlorovodíkovej
Materiál:	sada hrubostenných skúmaviek, stojan na skúmavky, mikropipety, vodný kúpeľ (hrniec s vodou), varič, laboratórna trepačka
Postup:	<p>Každá zo siedmich očíslovaných skúmaviek v stojane obsahuje zásobný roztok jednej z nasledujúcich látok: arabinózu (aldopentóza), fruktózu (keto-hexóza), glukózu (aldohexóza), laktózu (redukujúci disacharid), sacharózu (neredukujúci disacharid), škrob (polysacharid) a destilovanú vodu.</p> <p>Do siedmich prázdnych skúmaviek (nezabudneme si ich očíslovať) napipetujeme po 2 ml z uvedených zásobných roztokov. Do každej z nich pridáme 1 –</p>

	<p>3 kvapky Molischovho činidla a 2 ml koncentrovanej kyseliny sírovej (po stenách skúmavky). Na rozhraní dvoch vrstiev (vrchná etanolová, spodná kyselinová) sa v prípade prítomnosti sacharidov vytvorí tmavofialový prstenec. Premiešaním nadobudnú roztoky sacharidov fialové sfarbenie. Roztok vody sa sfarbí na žltohnedo. Molischova reakcia je negatívna pre vodu, ktorú možno týmto spôsobom odlišiť od ostatných roztokov.</p> <p>Do ďalších šiestich skúmaviek napipetujeme po 2 ml zo zásobných roztokov sacharidov. Do každej z nich pridáme 2 – 4 kvapky roztoku jódu. Obsah skúmavky obsahujúcej škrob sa sfarbí na tmavomodro.</p> <p>Do nasledujúcich piatich skúmaviek napipetujeme po 2 ml Benediktiho činidla a pridáme po 1 ml zo zásobných roztokov sacharidov, ktoré zatiaľ neboli priradené. Roztoky v skúmavkách premiešame a ponoríme na 2 – 5 min do horúceho vodného kúpeľa. Po vybratí a vychladnutí skúmaviek zaznamenáme farebné zmeny roztokov. Pozitívnu Benediktiho reakciu dávajú redukujúce sacharidy.</p> <p>Do štyroch skúmaviek napipetujeme po 2 ml z roztokov nepriradených redukujúcich sacharidov, pridáme po 1 ml Barfoedovho činidla a ponoríme na 5 – 10 min do vriaceho vodného kúpeľa. Po vybratí a ochladení skúmaviek pozorujeme v prípade monosacharidov vznik tmavočervenej zrazeniny. Redukujúci disacharid (v našom prípade laktóza) reaguje až po dlhšom zahrievaní (10 – 20 min). Barfoedovou reakciou odlišíme redukujúci disacharid laktózu od monosacharidov.</p> <p>Na odlišenie ketohexózy (fruktóza) od aldohexózy (glukóza) a aldopentózy (arabinóza) použijeme Seliwanovovu reakciu. Do troch skúmaviek napipetujeme po 1 ml zo zásobných roztokov zostávajúcich troch neurčených monosacharidov, pridáme po 2 ml Seliwanovovho činidla a ponoríme na 1 – 3 min do vriaceho vodného kúpeľa. V skúmavke s fruktózou pozorujeme vznik višňovočerveného sfarbenia. Roztok s glukózou sa sfarbí na oranžovo.</p> <p>Na jednoznačný dôkaz fruktózy využijeme Rothenfusserovu reakciu. Do troch skúmaviek napipetujeme po 1 ml z tých istých zásobných roztokov ako v prípade predošlej reakcie. Pridáme po 1 ml Rothenfusserovho činidla a ponoríme na 3 – 5 min do horúceho vodného kúpeľa. Roztok s fruktózou má tmavomodré sfarbenie.</p> <p>Na rozlíšenie arabinózy od glukózy použijeme reakciu s floroglucínom. Do dvoch skúmaviek odpipetujeme po 2 ml floroglucínu, pridáme po 6 – 10 kvapiek z posledných dvoch neurčených zásobných roztokov a skúmavky vložíme do horúceho vodného kúpeľa na 1 – 2 min. Roztok s arabinózou sa sfarbí na bordovo.</p>
Pozorovanie:	Zaznamenáme zafarbenia roztokov v závislosti od použitej reakcie.
Záver:	Ku každej očíslovanej skúmavke s príslušným roztokom priradíme sacharid.

TÉMA	SACHARIDY
Úloha 18:	Stanovenie redukujúcich sacharidov Schoorlovou metódou
Princíp:	<p>Dvojmocná meď Fehlingovho činidla (CuSO_4) sa redukuje redukujúcimi sacharidmi na oxid meďný (Cu_2O):</p> $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2 \text{CuSO}_4 + 5 \text{NaOH} \rightleftharpoons \text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7\text{Na} + 2 \text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{Cu}_2\text{O} + 3 \text{H}_2\text{O}$ <p>Nadbytok meďnatej soli sa po okyslení kyselinou sírovou zredukuje jodidom draselným:</p> $2 \text{CuSO}_4 + 4 \text{KI} \xrightarrow{\text{H}_2\text{SO}_4} 2 \text{CuI} + 2 \text{K}_2\text{SO}_4 + \text{I}_2$ <p>Elementárny jód (I_2), ktorý sa pri redukcii uvoľní, sa stanoví titračne roztokom tiosíranu sodného:</p> $\text{I}_2 + 2 \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \rightleftharpoons 2 \text{NaI} + \text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ <p style="text-align: right;">tetracionát sodný</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. roztok Fehling I (6,928 g síranu meďnatého $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ v 100 ml destilovanej vody) 2. roztok Fehling II (34,6 g vínanu sodnodraselného $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ a 10 g hydroxidu sodného v 100 ml destilovanej vody) <p>Činidlo sa pripraví tesne pred použitím zmiešaním roztokov Fehling I a Fehling II v pomere 1:1.</p> <ol style="list-style-type: none"> 3. jodid draselný p.a. 4. zriedená kyselina sírová (1:4) 5. 0,1 M roztok tiosíranu sodného 6. 1 % roztok škrobu v nasýtenom roztoku chloridu sodného 7. vzorka glukózy s neznámou koncentráciou
Materiál:	3 titračné banky, sklenené pipety s nastavcom, byreta s objemom 25 ml, váhy, varič, varné kamienky
Postup:	<p>Z pripravenej vzorky glukózy odpipetujeme do dvoch titračných baniek po 5 ml. V tretej titračnej banke si pripravíme tzv. slepý pokus. Glukózu nahradíme 5 ml destilovanej vody. Do všetkých troch baniek pridáme po 10 ml čerstvého roztoku Fehlingovho činidla a roztok doplníme destilovanou vodou na objem 25 ml. Nakoniec pridáme varné kamienky a banky s roztokmi necháme priamo na variči zovrieť a ešte 2 minúty varíme. Po ochladení pod tečúcou studenou vodou na teplotu miestnosti do každej z baniek pridáme roztok, ktorý obsahuje 1 g jodidu draselného v 5 ml destilovanej vody (<i>pripravíme si vopred pre všetky tri banky – navážime 3 g KI a rozpustíme v 15 ml destilovanej vody. Potom už len rozpipetujeme do jednotlivých baniek</i>). Na záver pridáme 5 ml zriedenej kyseliny sírovej (1:4) a niekoľko kvapiek roztoku škrobu. Titrujeme tiosíranom sodným do odfarbenia roztoku. Za rovnakých podmienok titrujeme aj druhú banku so vzorkou a slepý pokus.</p>
Vyhodnotenie:	<p>Zo spotrieb oboch titrácií vzoriek zistíme priemernú spotrebu tiosíranu sodného. Vypočítame rozdiel medzi spotrebou pri slepom pokuse a priemernou spotrebou pri vzorke. Pomocou Schoorlovej tabuľky určíme množstvo glukózy vo vzorke, porovnáme so skutočnou hodnotou a vypočítame relatívnu chybu (v %).</p>
Záver:	Uvedieme množstvo glukózy vo vzorke (v mg) spolu s relatívnou chybou.

TABUĽKA 3.1 Schoorlova tabuľka

0,1 M Na ₂ S ₂ O ₃ (ml)	glukóza (mg)	0,1 M Na ₂ S ₂ O ₃ (ml)	glukóza (mg)	0,1 M Na ₂ S ₂ O ₃ (ml)	glukóza (mg)
0,1	0,3	4,1	13,0	8,1	25,9
0,2	0,7	4,2	13,3	8,2	26,2
0,3	1,0	4,3	13,6	8,3	26,6
0,4	1,3	4,4	14,0	8,4	26,9
0,5	1,6	4,5	14,3	8,5	27,3
0,6	1,9	4,6	14,6	8,6	27,6
0,7	2,2	4,7	15,0	8,7	28,0
0,8	2,5	4,8	15,3	8,8	28,3
0,9	2,8	4,9	15,6	8,9	28,6
1,0	3,2	5,0	15,9	9,0	28,9
1,1	3,5	5,1	16,3	9,1	29,3
1,2	3,8	5,2	16,6	9,2	29,6
1,3	4,1	5,3	16,9	9,3	30,0
1,4	4,4	5,4	17,2	9,4	30,3
1,5	4,7	5,5	17,6	9,5	30,6
1,6	5,0	5,6	17,9	9,6	31,0
1,7	5,3	5,7	18,2	9,7	31,3
1,8	5,6	5,8	18,5	9,8	31,6
1,9	5,9	5,9	18,9	9,9	31,9
2,0	6,3	6,0	19,2	10,0	32,3
2,1	6,6	6,1	19,5	10,1	32,7
2,2	6,9	6,2	19,8	10,2	33,0
2,3	7,2	6,3	20,0	10,3	33,3
2,4	7,5	6,4	20,5	10,4	33,7
2,5	7,8	6,5	20,8	10,5	34,0
2,6	8,1	6,6	21,1	10,6	34,3
2,7	8,5	6,7	21,4	10,7	34,6
2,8	8,8	6,8	21,8	10,8	35,0
2,9	9,1	6,9	22,1	10,9	35,3
3,0	9,4	7,0	22,4	11,0	35,7
3,1	9,8	7,1	22,7	11,1	36,0
3,2	10,1	7,2	23,0	11,2	36,3
3,3	10,4	7,3	23,3	11,3	36,7
3,4	10,7	7,4	23,7	11,4	37,0
3,5	11,0	7,5	24,0	11,5	37,3
3,6	11,4	7,6	24,3	11,6	37,6
3,7	11,7	7,7	24,6	11,7	38,0
3,8	12,0	7,8	24,9	11,8	38,3
3,9	12,3	7,9	25,2	11,9	38,7
4,0	12,6	8,0	25,6	12,0	39,0

TÉMA	SACHARIDY
Úloha 19:	Kvalitatívna analýza sacharidov tenkovrstvovou chromatografiou
Princíp:	<i>Pri chromatografii na tenkej vrstve mobilná fáza prechádza tenkou vrstvou jemnozrnného adsorbentu alebo nosiča zakotvenej fázy, ktorý je buď voľne sypaný alebo vhodne fixovaný na podložke (hliníková fólia, sklenená platnička). Chromatografia na tenkej vrstve (TLC = thin-layer chromatography) je jednou z úprav adsorpčnej chromatografie, ktorá sa používa predovšetkým ako mikro-analytická metóda pre najrôznejšie skupiny látok. Pomocou nej môžeme veľmi rýchlo a ľahko analyzovať, resp. kontrolovať čistotu látok a ak máme vhodné štandardy, môžeme zároveň jednotlivé látky v zmesi identifikovať.</i>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. štandardné 1 % roztoky sacharidov (arabinóza, fruktóza, glukóza, ribóza, sacharóza) 2. zmes etylesteru kyseliny octovej, izopropanolu a vody v pomere 28:24:6 (mobilná fáza) 3. chromatografické hliníkové platne s fixovanou vrstvou silikagelu (Silufol), príp. oxidu hlinitého (Alufol) 4. neznáma vzorka (zmes dvoch sacharidov)
Materiál:	chromatografická komôrka s vrchnákom, automatické pipety, sušič na vlasy, ceruzka, pravítko, varič
Postup:	<p>Na chromatografickú platňu s rozmermi 10 × 10 cm si 1,5 cm od jej spodného okraja ceruzkou (nie perom) nakreslíme štartovaciu čiaru. Na ňu, 1,5 cm od ľavého okraja, zakreslíme rovnomerne od seba šesť bodov (vzdialenosť medzi bodmi 1,5 cm). Na prvých päť z nich nanesieme po 5 µl štandardných roztokov sacharidov (arabinóza, fruktóza, glukóza, ribóza, sacharóza). Šiesty bod je určený pre 3 µl vzorky (do zošita nezabudneme zapísať číslo vzorky). Roztoky nanášame opatrne automatickou pipetou. Pri nanášaní škvŕnu sušíme sušičom na vlasy. Pozíciu toho-ktorého sacharidu, resp. vzorky zaznamenáme ceruzkou priamo na platni pod príslušnou škvŕnou. Platňu s nanesenými roztokmi vložíme do chromatografickej komôrky s mobilnou fázou, prikryjeme vrchnákom a necháme vyvíjať vzostupne (približne 30 min). Pozor, hladina mobilnej fázy nesmie byť vyššie ako 1 cm nad spodným okrajom platne. V opačnom prípade by došlo k vyplaveniu sacharidov do mobilnej fázy. Keď je čelo mobilnej fázy 0,5 až 1 cm pod horným okrajom, platňu (chromatogram) vyberieme, ceruzkou označíme čelo mobilnej fázy a chromatogram vysušíme. Detekciu sacharidov vykonáme tak, že chromatogram držíme vo vodorovnej polohe niekoľko centimetrov nad varičom. Vysoká teplota (> 150 °C) spôsobí karamelizáciu sacharidov, čo sa prejaví tvorbou svetlohnedých škvŕn. Pritom dávame pozor, aby sme nespálili celú plochu chromatogramu. Nakoniec ceruzkou označíme stredy všetkých viditeľných škvŕn.</p>
Vyhodnotenie:	<p>Určíme hodnoty R_f (retenčný faktor) pre jednotlivé štandardy ako aj pre zložky neznámej vzorky a porovnáme ich navzájom. R_f hodnoty vypočítame ako podiel vzdialenosti stredy škvŕny od štartu (A) a vzdialenosti čela mobilnej fázy od štartu (B): $R_f = A/B$. R_f je funkciou adsorpčnej schopnosti stacionárnej fázy a pre danú látku závisí od systému, v ktorom je meraný, t.j. od teploty, druhu adsorbentu a od zloženia mobilnej fázy.</p>
Záver:	Uvedieme, ktoré dva sacharidy obsahovala naša vzorka. K protokolu priložíme aj chromatogram, príp. ho môžeme prekresliť do vyhodnotenia.

TÉMA	SACHARIDY
Úloha 20:	Stanovenie redukujúcich a neredukujúcich sacharidov v klíčiach rastlínach
Princíp:	<p>V rastlinnom materiáli sa stanovujú redukujúce sacharidy metódou opísanou Somogyim a Nelsonom. Zahrievaním roztoku sacharidu s Fehlingovým roztokom dochádza k redukcii meďnatého komplexu na oxid meďný. Aby sa zabránilo späťnej oxidácii Cu^+, potláča sa rozpustnosť kyslíka v roztoku prebytkom síranu sodného. Pomocou jednomocnej medi sa potom redukuje roztok kyseliny arzénomolybdénovej za vzniku modrozeleného zafarbenia, ktorého intenzita sa stanoví spektrofotometricky. Po hydrolyze kyselinou sírovou sa stanovia celkové sacharidy. Rozdiel oboch stanovení udáva obsah neredukujúcich sacharidov.</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. meďnaté činidlo A (25 g bezvodého uhličitanu sodného, 20 g vínanu sodnodraselného, 20 g hydrogenuhličitanu sodného a 200 g bezvodého síranu sodného rozpustíme v 800 ml destilovanej vody a doplníme destilovanou vodou do 1 litra. Roztok je potrebné udržiavať pri teplote 20 °C.) 2. meďnaté činidlo B (15 % roztok kryštalického síranu meďnatého v 100 ml destilovanej vody, okyslený 1 až 2 kvapkami kyseliny sírovej) 3. Nelsonovo činidlo (25 g molybdénanu amónneho rozpustíme v 450 ml destilovanej vody a pridáme 21 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Po premiešaní pridáme 3 g arzeničnanu sodného v 25 ml destilovanej vody a inkubujeme 48 hodín pri teplote 37 °C.) 4. 0,33 M roztok hydroxidu bárnateho 5. 5 % roztok síranu zinočnatého 6. 9 % roztok kyseliny sírovej 7. 0,33 M roztok hydrogenuhličitanu sodného 8. 0,33 M roztok uhličitanu sodného 9. morský piesok 10. pevný uhličitan vápenatý 11. štandard glukózy s koncentráciou 10 mg/100 ml 12. štandard sacharózy s koncentráciou 20 mg/100 ml
Materiál:	<p>klíčiace rastliny (klíčky pšenice), trecia miska, odparovacia miska, vodný kúpeľ, odmerná banka 25 ml, centrifúga, centrifugačné skúmavky, skladaný filter, filtračný lievik, sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nastavcom, absorpčný spektrofotometer, plastové kyvety, laboratórna trepačka, termostat, ultrazvuková vanička</p>
Postup:	<p>Klíčiace rastliny opláchneme destilovanou vodou. Rastlinné tkanivo usušíme papierovou vatou, odvážeme 1 g a rozstriháme nadrobno. Navážené tkanivo vložíme do odparovacej misky do pary nad vriacu vodu asi na 5 – 10 min. Po zmäknutí klíčky presunieme do trecej misky a rozotrieme s malým množstvom morského piesku, uhličitanu vápenateho a vody (5 – 8 ml). Zmes centrifugujeme 5 minút pri 3000 ot/min (900 g). Supernatant zlejeme do odmernej banky s objemom 25 ml. Priamo v centrifugačnej skúmavke sediment znova premiešame s malým množstvom destilovanej vody (5 – 8 ml) a po odstredení pridáme supernatant k prvému podielu. Tento rastlinný extrakt zbavíme bielkovín pridaním 2 ml 0,33 M roztoku hydroxidu bárnateho, obsah dobre pretrepeme a po niekoľkých minútach pripipetujeme 2 ml 5 % roztoku síranu zinočnatého. Obsah opäť dobre premiešame. Po doplnení destilovanou vodou na objem 25 ml extrakt prefiltrujeme cez hustý filter. Pre stanovenie sacharidov riedime tento bielkovín zbavený extrakt (filtrát) destilovanou vodou nasledovne: 1 ml filtrátu + 19 ml H_2O (20-násobné zriedenie).</p>

<p>Na stanovenie redukujúcich sacharidov použijeme štandard glukózy s koncentráciou 10 mg/100 ml. Do skúmaviek označených číslami 0, 1, 2, 3, 4, 5 pipetujeme roztoky štandardu podľa tabuľky 3.2 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených. Do skúmavky so vzorkou (vzorka 1) pipetujeme namiesto štandardu 1 ml riedeného extraktu.</p>								
TABUĽKA 3.2		0	1	2	3	4	5	vzorka 1
štandard glukózy	[ml]	–	0,2	0,4	0,6	0,8	1	–
extrakt (zriedený)	[ml]	–	–	–	–	–	–	1
destilovaná H ₂ O	[ml]	2	1,8	1,6	1,4	1,2	1	1
A + B (25:1)	[ml]	2	2	2	2	2	2	2
premiešať, 25 min variť vo vodnom kúpeli pri 100 °C ochladiť								
Nelsonovo činidlo	[ml]	2	2	2	2	2	2	2
premiešať a na 1 min vložiť do ultrazvukovej vaničky kvôli odstráneniu CO ₂ určiť absorbanciu pri 540 nm								
množstvo sacharidu v skúmavke	[mg]	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	x₁
absorbancia pri 540 nm		–						
<p>Na stanovenie celkovej koncentrácie sacharidov (redukujúcich + neredukujúcich) použijeme štandard sacharózy s koncentráciou 20 mg/100 ml. Do označených skúmaviek pipetujeme roztoky štandardu podľa tabuľky 3.3 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených. Do skúmavky so vzorkou (vzorka 2) pipetujeme rovnako ako v predošlom prípade namiesto štandardu 1 ml riedeného extraktu.</p>								
TABUĽKA 3.3		0	1	2	3	4	5	vzorka 2
štandard sacharózy	[ml]	–	0,2	0,4	0,6	0,8	1	–
extrakt (zriedený)	[ml]	–	–	–	–	–	–	1
destilovaná H ₂ O	[ml]	2	1,8	1,6	1,4	1,2	1	1
9 % H ₂ SO ₄	[ml]	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
premiešať, 30 min hydrolyzovať pri 80 – 90 °C (v termostate)								
0,33 M NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃	[ml]	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
A + B (25:1)	[ml]	2	2	2	2	2	2	2
premiešať, 25 min variť vo vodnom kúpeli pri 100 °C ochladiť								
Nelsonovo činidlo	[ml]	2	2	2	2	2	2	2
premiešať a na 1 min vložiť do ultrazvukovej vaničky kvôli odstráneniu CO ₂ určiť absorbanciu pri 540 nm								
množstvo sacharidu v skúmavke	[mg]	0	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20	x₂
absorbancia pri 540 nm		–						

Vyhodnotenie:	Pomocou kalibračných roztokov (skúmavky 1 až 5) zostrojíme dva kalibračné grafy (závislosť absorpcie štandardného roztoku glukózy, resp. sacharózy od ich množstva) a z nich určíme množstvo redukujúcich (x_1) a celkových (x_2) sacharidov v mg na 1 ml riedeného extraktu. Hodnoty x_1 a x_2 vynásobíme zriedením pôvodného extraktu (20-násobné zriedenie), čím získame množstvo redukujúcich a celkových sacharidov v 1 ml pôvodného neriedeného extraktu. Aby sme zistili množstvo sacharidov (v mg), ktoré sú obsiahnuté v 1 g klíčkov, je treba tieto hodnoty vynásobiť číslom 25. Množstvo neredukujúcich sacharidov vypočítame z rozdielu hodnôt pre celkové a redukujúce sacharidy.
Záver:	Uvedieme množstvo redukujúcich a neredukujúcich sacharidov nachádzajúcich sa v 1 g rastlinných klíčkov.

TÉMA	SACHARIDY
Úloha 21:	Izolácia kvasinkovej sacharázy
Princíp:	<p>Sacharáza (invertáza; systémový názov: β-D-fruktofuranozidfruktohydroláza; systémové číslo: EC 3.2.1.26) je enzým, ktorý štiepi sacharózu (okrem iných substrátov). Z jednej molekuly neredukujúcej sacharózy vznikajú 2 molekuly redukujúcich cukrov: D-glukózy a D-fruktózy.</p> $\text{sacharóza} \xrightarrow{\text{sacharáza}} \text{D-glukóza} + \text{D-fruktóza}$ <p>Vzniknutej ekvimolárnej zmesi glukózy a fruktózy hovoríme invertný cukor (invert).</p> <p>Michaelisova konštanta (K_m) pre sacharózu je $9,1 \times 10^{-3}$ M (v malátovom tlmivom roztoku, pH 4,6).</p> <p>Molekulová hmotnosť sacharázy z kvasiniek je 270 000 g/mol (270 kDa).</p> <p>Inhibitory: Enzým je inhibovaný kationmi ťažkých kovov (Ag^+, Cu^{2+}, Hg^{2+}). Je reverzibilne (vratným spôsobom) inhibovaný v nízkych koncentráciach močoviny, pri ktorých nedochádza k výrazným zmenám v štruktúre proteínu. Pri vysokých koncentráciach močoviny (8 M) dochádza k ireverzibilnej (nevratnej) inaktivácii, ktorá je sprevádzaná zmenami v sekundárnej a terciárnej štruktúre enzýmu.</p> <p>Stabilita: Je stabilný pri 4 °C, uskladnený v suchom stave. Vodný roztok enzýmu môže byť použitý po dobu niekoľkých týždňov, keď je uskladnený pri 4 °C.</p> <p>Kvasinková sacharáza nedifunduje cez bunkovú membránu, preto sa musí pred extrakciou rozrušiť rozotretím s kremenným pieskom.</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 10 g pekárenského droždia kremenný piesok
Materiál:	trečia miska, centrifúga, centrifugačné skúmavky, kadička s objemom 100 ml
Postup:	10 g čerstvého pekárenského droždia rozotrieme v trecej miske s troškou kremenného piesku. Pridávame po častiach 10 ml vody a rozotierame 5 min. Potom v niekoľkých dávkach pridáme ešte 20 ml vody a dobre premiešame. Suspenziu necháme stáť 30 min pri 25 – 30 °C. Potom ju 15 min centrifugujeme pri 3000 ot/min (1000 g). Supernatant prelejeme do čistej kadičky a použijeme na ďalšie stanovenia.
Úloha 22:	Stanovenie koncentrácie sacharázy Lowryho metódou
Princíp:	Pri Lowryho metóde bielkovina najprv reaguje s mednatými iónmi v alkalickej prostredí, pričom dochádza k ich redukcii na medné ióny. Následne dochádza účinkom medných iónov k redukcii kyseliny fosfomolybdeno-fosfovolfrámovej, ktorá je súčasťou Folinovho činidla. Finálny produkt tejto reakcie má modré sfarbenie.
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> roztok A: 2 % uhličitan sodný v 0,1 M hydroxide sodnom roztok B: 0,5 % pentahydrát síranu mednatého v 1 % tetrahydráte vánanu sodnodraselného (roztoky A, B zmiešame max. 4 hod. pred cvičením v pomere 50:1) Folinovo činidlo štandardný roztok bielkoviny (hovädzí albumín) s koncentráciou 50 mg/100 ml Britton tlmivý roztok (0,1 M acetátový tlmivý roztok) s pH 5,0 vzorka izolovanej sacharázy
Materiál:	sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nadstavcom, absorpčný spektrofotometer, plastové kyvety, laboratórna trepačka

Postup:	Na stanovenie koncentrácie sacharázy použijeme štandard hovädzieho albumínu s koncentráciou 50 mg/100 ml. Do označených skúmaviek pipetujeme roztok štandardu podľa tabuľky 3.4 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených. Do skúmavky so vzorkou pipetujeme namiesto štandardu 1 ml nariadeného roztoku sacharázy. Riedime acetátovým tlmivým roztokom s pH 5,0 , a to nasledovne: 1 ml roztoku izolovanej sacharázy + 4 ml tlmivého roztoku (5-násobné zriedenie).						
TABUĽKA 3.4							
	0 1 2 3 4 5 vzorka						
štandard albumínu [ml]	–	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	–
sacharáza (zriedená) [ml]	–	–	–	–	–	–	1
destilovaná H ₂ O [ml]	1	0,95	0,90	0,75	0,50	0,25	–
A + B (50:1) [ml]	5	5	5	5	5	5	5
	premiešať nechať 10 min reagovať						
Folinovo činidlo [ml]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	premiešať nechať 30 min reagovať určiť absorbanciu pri 750 nm						
množstvo bielkoviny v skúmavke [mg]	0	0,025	0,050	0,125	0,250	0,375	xs
absorbancia pri 750 nm	–						
Vyhodnotenie:	Pomocou kalibračných roztokov (skúmavky 1 až 5) zostrojíme kalibračný graf (závislosť absorbancie štandardného roztoku hovädzieho albumínu pri 750 nm od množstva) a z neho určíme množstvo vyizolovanej sacharázy v mg na 1 ml vzorky (xs) . Pre správne určenie jej koncentrácie je potrebné vynásobiť hodnotu xs zriedením pôvodného roztoku sacharázy.						
Úloha 23:	Stanovenie aktivity sacharázy na základe redukujúcich sacharidov						
Princíp:	<p>Enzymová aktivita je mierou množstva aktívneho enzýmu prítomného v roztoku. Uvádza sa v jednotkách 1 U (unit), príp. 1 kat (katal).</p> <p>1 U predstavuje množstvo enzýmu, ktoré katalyzuje pri saturácii substrátom premenu 1 μmol substrátu za 1 min.</p> <p>1 kat sa rovná množstvu enzýmu, ktoré premení 1 mol substrátu za 1 s.</p> <p>1 U odpovedá 16,67 nkat (nanokatal).</p> <p>K stanoveniu aktivity sacharázy možno využiť dve metódy:</p> <p>a) polarimetrická metóda je založená na zmenách optickej otáčavosti roztoku ("inverzia" sacharózy).</p> <p>b) spektrofotometrická metóda využíva redukčné vlastnosti jedného z reakčných produktov, a to D-glukózy. Tá v alkalickom prostredí a pri zvýšenej teplote (100 °C) redukuje 3,5-dinitrosalicylát (DNS) na 3-amino-5-nitrosalicylát, čo sa prejaví zmenou sfarbenia roztoku zo žltej na tmavooranžovú farbu:</p>						
	<p style="text-align: center;"> D-glukóza 3,5-dinitrosalicylát sodný (DNS) D-glukonát sodný 3-amino-5-nitrosalicylát sodný </p>						
	Sacharidy s keto skupinou (fruktóza) môžu v rámci svojej otvorenej formy izome-						

	<p><i>rizovať skrz sériu tautomérnych premiestnení, pričom vzniká aldehydová skupina. Takže, aj keď sa vo všeobecnosti ketózy považujú za redukujúce sacharidy, v skutočnosti je to ich izomér s aldehydovou skupinou, ktorý je redukujúci. Bez tejto izomerizácie ketóny nemôžu byť oxidované. K tomuto typu izomerizácie dochádza v alkalickom prostredí pri zvýšenej teplote (100 °C). Aktivitu sacharázy možno vypočítať na základe množstva vzniknutých redukujúcich sacharidov (invertu) za jednotku času.</i></p>							
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 0,1 M acetátový tlmivý roztok ($\text{CH}_3\text{COONa} + \text{CH}_3\text{COOH}$) s pH 5,0 štandardný roztok redukujúcich sacharidov s koncentráciou 200 mg/100 ml (100 mg fruktózy a 100 mg glukózy v 100 ml vodného roztoku, čo predstavuje roztok s molárnou koncentráciou invertného cukru 0,0056 M) zásobný roztok sacharózy s koncentráciou 0,5 M roztok sacharázy z úlohy 21 získaný zriedením supernatantu acetátovým tlmivým roztokom s pH 5,0 roztok DNS (3,5-dinitrosalicylát), ktorý pripravíme zmiešaním 8 g NaOH, 5 g kyseliny 3,5-dinitrosalicylvej a 150 g vínanu sodnodraselného v 1000 ml roztoku (výsledné molárne koncentrácie sú 0,2 M NaOH, 22 mM DNS a 0,5 M vínan sodnodraselný). 							
Materiál:	sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nastavcom, absorpčný spektrofotometer, plastové kyvety, laboratórna trepačka, vodný kúpeľ							
Postup:	<p>A. Kalibračný graf pre stanovenie množstva invertného cukru Na stanovenie množstva invertného cukru (ekvimolárna zmes glukózy a fruktózy) použijeme štandardný roztok obsahujúci zmes glukózy a fruktózy s celkovou koncentráciou 200 mg/100 ml. Do označených skúmaviek pipetujeme roztok štandardu podľa tabuľky 3.5 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených.</p>							
TABUĽKA 3.5		0	1	2	3	4	5	
štandard glukózy a fruktózy	[ml]	–	0,4	0,8	1,2	1,6	2	
destilovaná H_2O	[ml]	3	2,6	2,2	1,8	1,4	1	
DNS	[ml]	2	2	2	2	2	2	
		premiešať 8 min nechať reagovať vo vodnom kúpeli pri 100 °C ochladiť na laboratórnu teplotu určiť absorbanciu pri 540 nm						
množstvo invertu v skúmavke	[mg]	0	0,8	1,6	2,4	3,2	4	
látkové množstvo invertu	[μmol]	0	2,2	4,4	6,7	8,9	11	
absorbancia pri 540 nm		–						
	<p>B. Závislosť aktivity sacharázy od koncentrácie substrátu Do označených skúmaviek pipetujeme zásobný roztok sacharózy s koncentráciou 0,5 M podľa tabuľky 3.6 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených.</p>							
TABUĽKA 3.6		0	1	2	3	4	5	6
0,5 M roztok sacharózy	[ml]	0,5	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
0,1 M acetátový tlmivý roztok (pH 5,0)	[ml]	0,5	0,85	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4
		premiešať						
sklenenou pipetou rýchlo pridať postupne do každej skúmavky roztok sacharázy, obsah skúmavky premiešať a súčasne zaznamenať čas :								

sacharáza (zriedená) [ml]	–	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
po uplynutí 10 min (pre každú skúmavku osobitne):							
DNS [ml]	2	2	2	2	2	2	2
premiešať							
destilovaná H ₂ O [ml]	2	2	2	2	2	2	2
premiešať 8 min nechať reagovať vo vodnom kúpeli pri 100 °C ochladiť na laboratórnu teplotu určiť absorbanciu pri 540 nm							
začiatočná koncentrácia substrátu (sacharózy) v 1 ml [M]	–	0,025	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25
absorbancia pri 540 nm	–						
látkové množstvo invertu (glukóza + fruktóza) v skúmavke [μmol]	–	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆
aktivita sacharázy [U/ml]	–	a ₁	a ₂	a ₃	a ₄	a ₅	a ₆
roztok v skúmavke s označením „0“ použijeme pri meraní absorbancie ako referenciu							
Vyhodnotenie:	<p>A. Pomocou kalibračných roztokov (skúmavky 1 až 5 v tabuľke 3.5) zostrojíme kalibračný graf (závislosť absorbancie štandardného roztoku zmesi glukózy a fruktózy – invertu – od látkového množstva v μmol).</p> <p>B. Z kalibračného grafu v časti A zistíme látkové množstvá sacharázou vzniknutého invertného cukru (x₁ až x₆, tabuľka 3.6).</p> <p>Následne z týchto údajov o množstve vypočítame aktivitu sacharázy (a₁ až a₆, tabuľka 3.6) a prepočítame na 1 ml pôvodného neriedeného enzýmového preparátu.</p> <p>Zostrojíme grafickú závislosť aktivity sacharázy (os y) od začiatočnej koncentrácie substrátu (os x).</p> <p>Príklad výpočtu aktivity a špecifickej aktivity sacharázy:</p> <p>Predpokladajme, že za daných podmienok (20 °C, pH 5,0), 0,1 ml riedeného enzýmu uvoľní za 10 min reakcie 2,2 μmol invertu (ekvimolárna zmes glukózy a fruktózy). Údaj 2,2 μmol bol získaný z kalibračného grafu v časti A.</p> <p>V tom prípade by sa pôsobením 1 ml použitého riedeného enzýmu za 1 min uvoľnilo:</p> $\frac{2,2 \mu\text{mol}}{10 \text{ min}} \times 10 = 2,2 \mu\text{mol invertu/min}$ <p>1 ml pôvodného (neriedeného) enzýmu by v našom prípade (5-násobné zriedenie) uvoľnilo 5-krát viac invertu:</p> $2,2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \times 5 = 11 \mu\text{mol invertu/min}$ <p>Keďže pre medzinárodne stanovenú enzýmovú jednotku (U) platí (viď Princíp k tejto úlohe): 1 U = 1 μmol substrátu, resp. produktu za minútu, predstavuje vypočítaný údaj hodnotu aktivity.</p> <p>Záver: 1 ml pôvodného preparátu sacharázy má aktivitu zodpovedajúcu za podmienok použitej metódy (20 °C, pH 5,0) 11 μmol/min, t.j. 11 U.</p> <p>Ak by sme chceli zistiť špecifickú aktivitu enzýmu, potrebovali by sme na to údaj o množstve enzýmu v mg/ml (viď úloha 22). Predpokladajme, že množstvo enzýmu v pôvodnom preparáte je 0,5 mg/ml. V tom prípade by sa špecifická aktivita počítala nasledovne:</p> $\frac{11 \frac{\text{U}}{\text{ml}}}{0,5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}} = 22 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$ <p>Záver: Špecifická aktivita vyzolovanej sacharázy je za vyššie uvedených podmienok 22 U/mg.</p>						

Úloha 24:		Vplyv pH na aktivitu sacharózy						
Reagencie:	1. 0,1 M acetátové tlmivé roztoky ($\text{CH}_3\text{COONa} + \text{CH}_3\text{COOH}$) s pH 3,6; 4,6; 5,3 a 5,9 2. 0,1 M roztok kyseliny chlorovodíkovej (pH 1,8) 3. 1 % roztok hydroxidu sodného (pH 13) 4. 0,5 M zásobný roztok sacharózy 5. roztok sacharózy z úlohy 21 získaný zriedením supernatantu acetátovým tlmivým roztokom s pH 5,0							
Materiál:	sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nastavcom, absorpčný spektrofotometer, plastové kyvety, laboratórna trepačka, vodný kúpeľ							
Postup:	Do označených skúmaviek pipetujeme zo zásobného roztoku sacharózy s koncentráciou 0,5 M podľa tabuľky 3.7 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených.							
TABUĽKA 3.7		0	1	2	3	4	5	6
0,5 M sacharóza [ml]		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
acetátový tlmivý roztok	pH	3,6	–	3,6	4,6	5,3	5,9	–
	objem [ml]	0,9	–	0,8	0,8	0,8	0,8	–
0,1 M HCl [ml]		–	0,8	–	–	–	–	–
1 % NaOH [ml]		–	–	–	–	–	–	0,8
premiešať								
sklenenou pipetou rýchlo pridať postupne do každej skúmavky roztok sacharózy, skúmavku premiešať a súčasne zaznamenať čas :								
sacharóza (zriedená) [ml]		–	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
po uplynutí 10 min (pre každú skúmavku osobitne):								
DNS [ml]		2	2	2	2	2	2	2
premiešať								
destilovaná H_2O [ml]		2	2	2	2	2	2	2
premiešať 8 min nechať reagovať vo vodnom kúpeli pri 100 °C ochladiť na laboratórnu teplotu určiť absorbanciu pri 540 nm								
pH		–	1,8	3,6	4,6	5,3	5,9	13
absorbancia pri 540 nm		–						
látkové množstvo invertu (glukóza + fruktóza) v skúmavke [μmol]		–	x'_1	x'_2	x'_3	x'_4	x'_5	x'_6
aktivita sacharózy [U/ml]		–	a'_1	a'_2	a'_3	a'_4	a'_5	a'_6
roztok v skúmavke s označením „0“ použijeme pri meraní absor- bancie ako referenciu								
Vyhodnotenie:	Z kalibračného grafu v úlohe 23 (časť A) zistíme látkové množstvá invertného cukru (x'_1 až x'_6 , tabuľka 3.7). Vypočítame aktivitu sacharózy (a'_1 až a'_6 , tabuľka 3.7) a zostrojíme grafickú závislosť aktivity sacharózy (os y) od pH (os x). Názorný príklad výpočtu aktivity je uvedený vo vyhodnotení v úlohe 23 .							

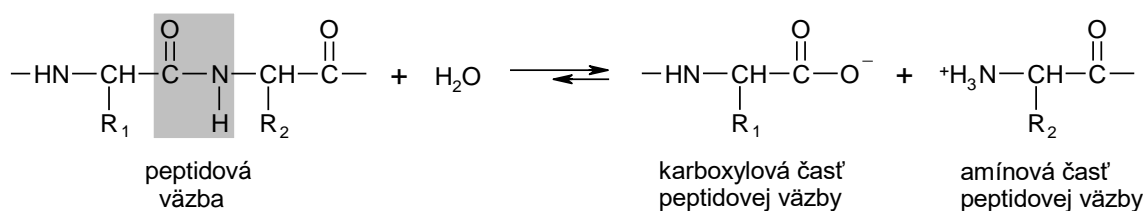
4 ENZÝMY

Enzýmy (z gréckeho *enzymon* = v droždí), katalyzátory v biologických systémoch, sú pozoruhodné molekulové prístroje, ktoré určujú charakter chemickej reakcie. Enzýmy sa tiež podieľajú na transformácii rôznych foriem energie. Najzaujímavejšími charakteristikami enzýmov sú ich **katalytická sila (efektivita)** a **špecificita**. Pôsobenie mnohých enzýmov je regulované. Väčšina známych enzýmov sú proteíny. Objav katalyticky aktívnych RNA molekúl však poukazuje na to, že proteíny nemajú absolútny monopol v katalýze.

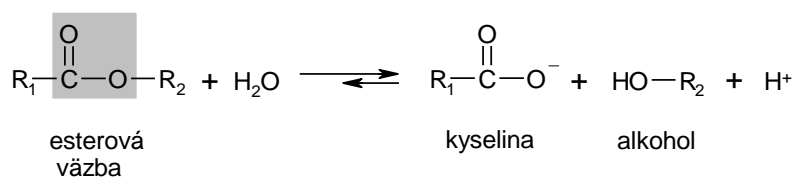
Proteíny ako trieda makromolekúl sú veľmi efektívne pri katalýze rôznych chemických reakcií, pretože sú schopné špecificky viazať veľmi rôzne molekuly. Využitím celého repertoára intermolekulových síl, enzýmy prinášajú substráty do optimálnej vzdialenosti a orientácie, umožňujúc tak efektívnu prestavbu chemických väzieb za vzniku produktov katalyzovanej reakcie. V podstate, enzýmy katalyzujú reakcie tak, že **stabilizujú prechodný stav substrátu**, t.j. stav s najvyššou energiou. Týmto spôsobom vlastne selektívne určujú, ktorá chemická reakcia prebehne.

Enzýmy urýchľujú reakcie minimálne miliónkrát. Bez ich prítomnosti by väčšina reakcií v biologických systémoch nemohla prebiehať, resp. by prebiehala veľmi pomaly. Dokonca aj taká jednoduchá reakcia, akou je hydratácia oxidu uhličitého, je katalyzovaná enzýmom **karboanhydrázou**. Prenos CO₂ z tkanív do krvi a následne do alveolárneho vzduchu by bol menej efektívny bez prítomnosti tohto enzýmu. V skutočnosti, karboanhydráza je jedným z najrýchlejších enzýmov, ktoré poznáme. Každá molekula enzýmu hydratuje 10⁵ molekúl CO₂ za sekundu. Rýchlosť katalyzovanej reakcie je 10⁷-krát vyššia ako nekatalyzovanej.

Enzýmy sú vysoko špecializované čo sa týka reakcie, ktorú katalyzujú, a výberu reaktantov, s ktorými interagujú (**tabuľka 4.1**). Reaktanty sa nazývajú **substráty**. Enzýmy zvyčajne katalyzujú jedinú chemickú reakciu alebo niekoľko veľmi podobných reakcií. Paralelné reakcie, ktoré by viedli k tvorbe podobných, ale nežiaducich produktov, sa pri enzymatických reakciách vyskytujú zriedkavo, na rozdiel od nekatalyzovaných reakcií. Stupeň špecificity voči substrátu je zvyčajne veľmi vysoký, až absolútny (výnimku tvoria tzv. "**moonlighting**" alebo "**námesačné**" proteíny). Ako príklad špecificity uvádzame **proteolytické enzýmy - proteázy**. Tieto enzýmy katalyzujú hydrolýzu peptidovej väzby:

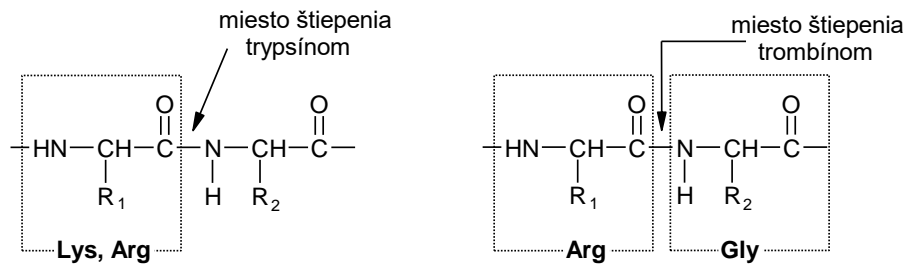


Väčšina proteolytických enzýmov taktiež katalyzuje inú, avšak podobnú reakciu – hydrolýzu esterovej väzby:



TABUĽKA 4.1 Klasifikácia enzýmov. Pri každej triede sú uvedené tri príklady enzýmov spolu s reakciou, ktorú daný enzým katalyzuje.	
<p>1 Oxidoreduktázy</p> <p>1.1.1.1 <i>alkoholdehydrogenáza</i> 1.1.3.4 <i>glukózaoxidáza</i> 1.11.1.6 <i>kataláza</i></p>	<p>- katalyzujú intermolekulové oxidačno-redukčné premeny - oxidoredukčné deje realizujú buď prenosom atómov vodíka (transhydrogenázy) alebo elektrónov (transelektronázy), príp. zabudovaním atómu kyslíka do substrátu (oxygenázy) - majú povahu zložených bielkovín</p> <p>etanol + NAD⁺ → acetaldehyd + NADH β-D-glukóza + O₂ → D-glukono-δ-laktón + H₂O₂ 2 H₂O₂ → 2 H₂O + O₂</p>
<p>2 Transferázy</p> <p>2.3.1.9 <i>acetyl-CoA-acetyltransferáza</i> 2.7.1.1 <i>hexokináza</i> 2.7.7.6 <i>RNA-polymeráza</i></p>	<p>- realizujú prenos skupín (-CH₃, -NH₂, glukózový zvyšok, atď.) v aktivovanej forme z ich donoru na akceptor - patria medzi zložené bielkoviny - zúčastňujú sa mnohých biosyntetických dejov</p> <p>2 acetyl-CoA → CoA + acetoacetyl-CoA ATP + D-hexóza → ADP + D-hexóza-6-fosfát m nukleozidtrifosfát + RNA_n → RNA_{n+m} + mPP_i</p>
<p>3 Hydrolázy</p> <p>3.1.3.9 <i>glukóza-6-fosfatáza</i> 3.4.17.1 <i>karboxypeptidáza A</i> 3.6.1.3 <i>adenozíntrifosfatáza</i></p>	<p>- hydrolyticky štiepia väzby, ktoré vznikli kondenzáciou, napr. peptidové, glykozidové, esterové - majú povahu jednoduchých bielkovín</p> <p>D-glukóza-6-fosfát + H₂O → D-glukóza + monofosfát peptidyl-L-aminokyselina + H₂O → peptid + L-aminokyselina ATP + H₂O → ADP + P_i</p>
<p>4 Lyázy</p> <p>4.2.1.1 <i>karboanhydráza</i> 4.2.1.2 <i>fumaráthydratáza</i> 4.3.1.17 <i>serindeamináza</i></p>	<p>- katalyzujú nehydrolytické štiepenie a vznik (pokiaľ nie je energeticky náročný) väzieb C-C, C-O, C-N, apod. Prítomnosť väčšinou zo substrátu odštiepujú alebo doň vnášajú malé molekuly (H₂O, CO₂, NH₃) - majú povahu zložených bielkovín</p> <p>H⁺ + HCO₃⁻ ↔ CO₂ + H₂O L-malát → fumarát + H₂O L-serín → pyruvát + NH₃</p>
<p>5 Izomerázy</p> <p>5.1.2.1 <i>laktátracemáza</i> 5.1.3.1 <i>ribulóza-fosfát-3-epimeráza</i> 5.3.1.1 <i>triózafosfátizomeráza</i></p>	<p>- realizujú vnútromolekulové presuny atómov a ich skupín, teda vzájomné premeny izomérov - najmenej početná skupina enzýmov väčšinou povahy jednoduchých bielkovín</p> <p>D-laktát ↔ L-laktát D-ribulóza-5-fosfát ↔ D-xylulóza-5-fosfát D-glyceraldehyd-3-fosfát ↔ dihydroxyacetónfosfát</p>
<p>6 Ligázy</p> <p>6.1.1.7 <i>alanyl-tRNA-syntetáza</i> 6.4.1.1 <i>pyruvátkarboxyláza</i> 6.5.1.1 <i>DNA-ligáza</i></p>	<p>- katalyzujú vznik energeticky náročných väzieb za súčasného rozkladu látky uvoľňujúcej energiu (ATP) - uplatňujú sa pri rôznych biosyntézach - majú povahu zložených bielkovín</p> <p>ATP + L-Ala + tRNA^{Ala} → AMP + difosfát + L-alanyl-tRNA^{Ala} ATP + pyruvát + CO₂ + H₂O → ADP + monofosfát + oxalacetát ATP + DNA_n + DNA_m → AMP + difosfát + DNA_{n+m}</p>

Proteolytické enzýmy sa výrazne líšia v stupni substrátovej špecificity. **Subtilizín**, ktorý sa nachádza v niektorých baktériách, je dosť "nevyberavý", čo sa týka charakteru príľahlého aminokyselinového zvyšku štiepenej peptidovej väzby. **Trypsín** je zase dosť špecifický a katalyzuje štiepenie peptidovej väzby iba na karboxylovej strane lyzínového a arginínového zvyšku. **Trombín**, enzým zúčastňujúci sa procesu zrážania krvi, je ešte viac špecifickejší než trypsin. Katalyzuje hydrolyzu peptidovej väzby medzi Arg a Gly, aj to iba v určitých špecifických peptidových sekvenciách:

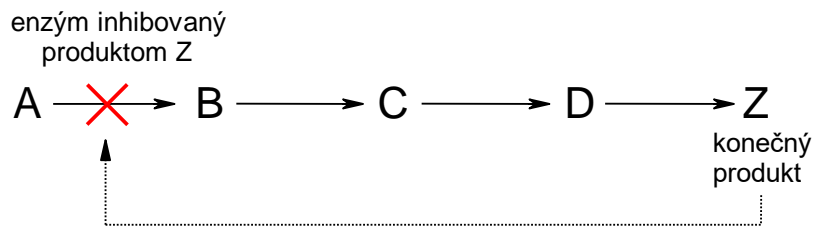


Iným príkladom veľmi špecifického katalyzátora je **DNA-polymeráza I** – templátovo-riadený enzým. Sekvencia (poradie) nukleotidov v DNA reťazci, ktorý je syntetizovaný, je určená sekvenciou nukleotidov v inom DNA reťazci, ktorý slúži ako templát (vzor). DNA-polymeráza I je pozoruhodne presný enzým, nesprávny nukleotid je zabudovaný do novosyntetizovaného reťazca, resp. enzým urobí chybu, po približne 1 milión správne zabudovaných nukleotidov. Je to preto, že DNA-polymeráza sama po sebe kontroluje správnosť zabudovania nukleotidu.

Ako výnimku z typickej enzýmovej špecificity sme uviedli tzv. "**námesačné**" enzýmy. Tieto enzýmy sa niekedy označovali aj ako "**katalyticky promiskuitné**" enzýmy. Námesačné proteíny sú tie, ktoré majú viacero funkcií, resp. sú schopné katalyzovať rozdielne reakcie. Ich schopnosť mať viacero funkcií závisí od ich lokalizácie v bunke, typu bunky, oligomérneho stavu, resp. koncentrácie ligandu, substrátu, kofaktora alebo produktu v bunke. Tieto mechanizmy sa vzájomne nevylučujú a v mnohých prípadoch funkcia takéhoto enzýmu závisí od kombinácie týchto faktorov. Príkladom môže byť známy **tetramérny** enzým (ľudský), zúčastňujúci sa glykolýzy **glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza**, ktorý katalyzuje premenu glyceraldehyd-3-fosfátu na 1,3-difosfoglycerát. V monomérnej forme sa z neho stáva DNA-glykoláza, ktorá odstraňuje uracil nachádzajúci sa v DNA reťazci, ktorý môže vznikáť deamináciou cytozínu alebo inkorporáciou deoxyuridín-5'-trifosfátu (dUTP) počas DNA syntézy.

Regulácia katalytickej aktivity enzýmov

Enzýmy, ktoré katalyzujú prvý krok v biosyntetickej dráhe sú zvyčajne inhibované konečným produktom. Biosyntézu izoleucínu v baktériách ilustruje tento typ kontroly, ktorá sa nazýva **inhibícia spätnou väzbou**. Treonín sa transformuje na izoleucín v piatich krokoch, prvý krok katalyzuje **treoníndeamináza**. Tento enzým je inhibovaný, keď izoleucín dosiahne dostatočne vysokú koncentráciu. Izoleucín inhibuje enzým naviazaním sa na regulačné miesto, ktoré je odlišné od katalytického miesta. Tento typ inhibície je sprostredkovaný reverzibilnou **alosterickou interakciou**. Ak koncentrácia izoleucínu poklesne pod istú úroveň, treoníndeamináza sa stane znova aktívnou.



Enzýmy sú taktiež regulované **regulačnými proteínmi**, ktoré ich môžu stimulovať alebo inhibovať. Aktivita mnohých enzýmov je regulovaná **kalmodulínom**, proteín s molekulovou hmotnosťou 17 000 g/mol, ktorý funguje ako senzor na prítomnosť vápnika takmer vo všetkých eukaryotických bunkách. Väzba Ca^{2+} do viacerých väzbových miest na kalmodulíne indukuje veľkú konformačnú zmenu, ktorá ho zmení z neaktívnej na aktívnu formu. Aktivovaný kalmodulín sa následne viaže na viacero iných enzýmov alebo cieľových proteínov v bunke a modifikuje tým ich aktivitu.

Kovalentná modifikácia je ďalším mechanizmom enzýmovej regulácie. Mnoho enzýmov je kontrolovaných reverzibilným pripojením fosforylovej skupiny na špecifické serínové alebo treonínové aminokyselinové zvyšky (týmto spôsobom je napríklad riadená aktivita enzýmov syntetizujúcich a degradujúcich glykogén). Fosforylácia tyrozínového zvyšku na receptore rastového faktora je kritickým krokom pri indukcii diferenciácie a proliferácie bunky. Špecifické enzýmy nazývané **kinázy** katalyzujú pripojenie fosforylovej skupiny; **fosfatázy** katalyzujú ich odstránenie hydrolýzou.

Niektoré enzýmy sú syntetizované ako neaktívne prekurzory, ktoré sú aktivované vo vhodnom fyziologickom čase a na konkrétnom mieste. Takýmto spôsobom sú riadené napríklad tráviace enzýmy – tento spôsob kontroly sa nazýva **proteolytická aktivácia**. Napríklad, **trypsinogén** je syntetizovaný v pankrease a je aktivovaný štiepením peptidovej väzby v tenkom čreve na aktívny **trypsin**. Tento typ kontroly sa využíva aj pri procesoch zrážania krvi. Enzymaticky neaktívne prekurzory proteolytických enzýmov sa nazývajú **zymogény**.

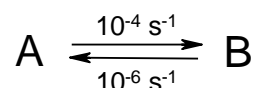
Enzýmy transformujú rozličné formy energie

V mnohých biochemických reakciách je energia reaktantov pretransformovaná s vysokou efektivitou na inú formu energie. Napríklad pri fotosyntéze je svetelná energia pretransformovaná do energie chemickej väzby. V mitochondriách je voľná energia obsiahnutá v malých molekulách získaných z potravy pretransformovaná na voľnú energiu ATP (adenozíntrifosfát). Energia obsiahnutá v chemických väzbách ATP je následne využívaná mnohými spôsobmi. Pri svalovej kontrakcii je energia z ATP premenená pomocou myozínu na mechanickú energiu. Membrány v bunkách a organelách obsahujú pumpy, ktoré využívajú energiu z ATP na transport molekúl a iónov proti chemickému a elektrickému gradientu.

Enzýmy nemenia reakčnú rovnováhu

Enzým je katalyzátor, a preto **nemôže meniť** rovnováhu chemickej reakcie. To znamená, že enzým urýchľuje priamu aj spätnú reakciu presne o ten istý faktor.

Uvažujme reakciu premeny látky *A* na látku *B*. Bez prítomnosti enzýmu je rýchlostná konštanta priamej reakcie $k_f 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a rýchlostná konštanta spätnej reakcie $k_r 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Rovnovážna konštanta *K* je daná pomerom týchto rýchlostných konštánt:

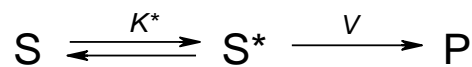


$$K = \frac{[B]}{[A]} = \frac{k_f}{k_r} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100$$

Rovnovážna koncentrácia B je 100-krát väčšia ako A , či je enzým prítomný, alebo nie. Dosiachnutie rovnováhy by trvalo viac ako hodinu pre nekatalyzovanú reakciu, avšak za použitia vhodného enzýmu by rovnováha mohla byť dosiahnutá za sekundu. **Enzýmy urýchľujú dosiahnutie stavu dynamickej rovnováhy, ale rovnováhu nemenia.**

Enzýmy urýchľujú reakcie stabilizáciou aktivovaného stavu

Chemická reakcia premeny substrátu S na produkt P prechádza cez aktivovaný (prechodový) stav S^* , ktorý má väčšiu voľnú energiu ako S aj ako P :



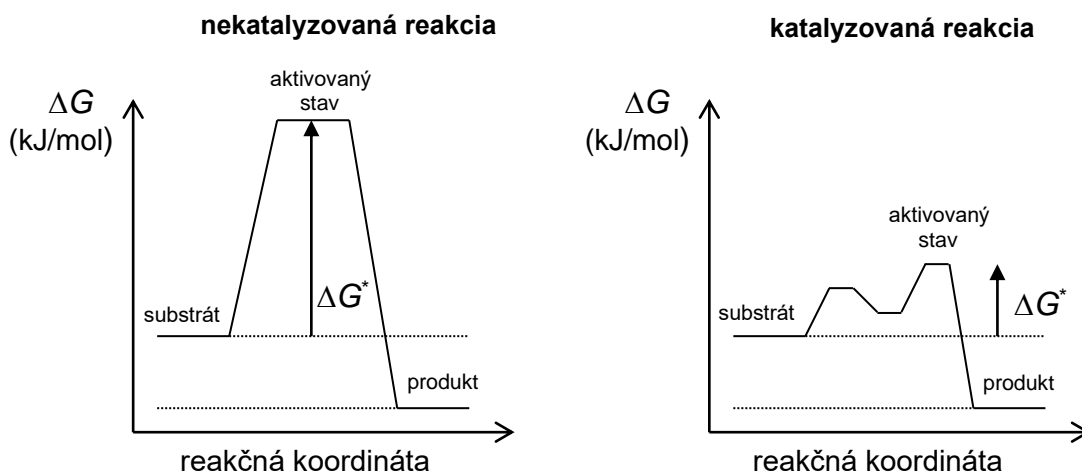
Aktivovaný stav je najmenej zastúpený počas reakcie, pretože má najvyššiu energiu (a je teda nestabilný). Voľná energia aktivácie ΔG^* sa rovná rozdielu voľnej energie medzi aktivovaným stavom a substrátom.

Reakčná rýchlosť V je úmerná koncentrácii aktivovaného stavu S^* , ktorá závisí od ΔG^* , pretože je v rovnováhe so substrátom S :

$$[S^*] = [S]e^{-\Delta G^*/RT}$$

$$V = \nu[S^*] = \frac{kT}{h}[S]e^{-\Delta G^*/RT}$$

kde k je Boltzmannova konštanta a h je Planckova konštanta. Pomer kT/h je pri 25 °C rovný $6,2 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$. Predpokladajme, že voľná energia aktivácie (aktivačná energia) je 28,5 kJ/mol. Pomer $[S^*]/[S]$ je potom 10^{-5} . Za predpokladu, že $[S] = 1$, rýchlosť reakcie $V = 6,2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Pokles ΔG^* o ~ 5,6 kJ/mol urýchli reakciu 10-krát.



Enzýmy urýchľujú reakcie znížením hodnoty ΔG^* , teda aktivačnej bariéry. Interakcia substrátu a enzýmu vytvára novú reakčnú cestu, v ktorej je energia aktivovaného stavu nižšia ako bez prítomnosti enzýmu. **Podstatou katalýzy je špecifická väzba aktivovaného stavu.**

Aktívne miesta enzýmov majú niektoré spoločné črty

Aktívne miesto enzýmu je oblasť, kde sa viažu substráty (a prostetická skupina, ak nejaká je) a obsahuje aminokyselinové zvyšky, ktoré sa priamo zúčastňujú pri prestavbe väzieb v substráte. Tieto zvyšky sa nazývajú **katalytické skupiny**. Napriek tomu, že sa enzýmy navzájom líšia štruktúrou, špecificitou a spôsobom katalýzy, je možné vysloviť niekoľko zovšeobecnení, čo sa týka týchto aktívnych miest:

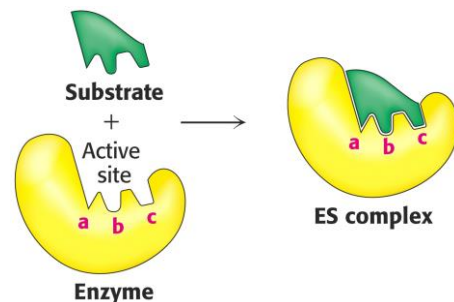
1. Aktívne miesto zaberá relatívne malú časť celkového objemu enzýmu. Väčšina aminokyselinových zvyškov enzýmu neprichádza do kontaktu so substrátom. Vzniká zaujímavá otázka: *prečo sú enzýmy také veľké?* Väčšina enzýmov je zložená z viac ako 100 aminokyselín, t.j. majú hmotnosť $\sim 10\,000$ g/mol a priemer väčší ako 25 Å (1 Å = 10^{-10} m).

2. Aktívne miesto je trojrozmerná samostatná jednotka, ktorá je vytvorená zo skupín, ktoré pochádzajú z rôznych častí lineárneho polypeptidového reťazca. Napríklad, aktívne miesto lyzozýmu je tvorené aminokyselinovými zvyškami 35, 52, 62, 63 a 101 z lineárneho polypeptidového reťazca zloženého zo 129 aminokyselín.

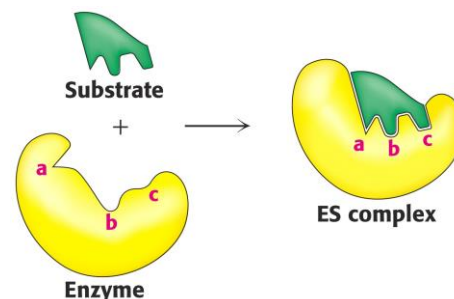
3. Substráty sú viazané do enzýmov mnohými slabými interakciami. Rovnovážna konštanta pre komplex enzým-substrát (ES) je zvyčajne 10^{-2} až 10^{-8} M, čo zodpovedá interakcii od ~ -15 do -50 kJ/mol. Nekovalentné interakcie v ES komplexe sú oveľa slabšie ako kovalentné väzby, ktoré majú energiu od -250 do -450 kJ/mol. Reverzibilné interakcie medzi molekulami sprostredkovávajú elektrostatické interakcie, vodíkové väzby, van der Waalsove sily a hydrofóbne interakcie. Van der Waalsove sily sa prejavujú iba v prípade, ak sa množstvo atómov substrátu súčasne dostane do tesnej blízkosti atómov enzýmu. Preto enzým a substrát musia mať komplementárne tvary. Smerový charakter vodíkových väzieb medzi enzýmom a substrátom určuje vysoký stupeň špecificity tejto interakcie.

4. Aktívne miesta sa nachádzajú v štrbinách a priehlbínach. Vo všetkých známych enzýmoch sa molekula substrátu viaže do štrbín alebo priehlbín. Voda je zvyčajne vytlačená z týchto priestorov a v aktívnom mieste sa nachádza iba v prípade, že sa zúčastňuje reakcie. Nepolárny charakter väčšiny väzobných miest zvyšuje afinitu pre substrát. Avšak, aktívne miesta často obsahujú aj polárne skupiny. V tomto mikroprostredí niektoré skupiny získavajú špeciálne vlastnosti nevyhnutné pre katalýzu. Prítomnosť polárnych skupín v aktívnych miestach porušuje pravidlo, že polárne skupiny sú v styku s vodným prostredím.

5. Špecificita interakcie závisí na presne definovanom usporiadaní atómov v aktívnom mieste. Pre interakciu musí mať substrát vhodný tvar. Metafora *Emila Fishera* "kľúča a zámky" (obrázok 4.1), vyslovená v roku 1890, sa ukázala byť stimulujúca a veľmi plodná. Avšak, v súčasnosti je zrejme, že aktívne miesta mnohých enzýmov sa výrazne modifikujú v dôsledku väzby substrátu. Aktívne miesto nadobúda komplementárny tvar až **po naviazaní** substrátu. Tento proces dynamického rozpoznávania bol nazvaný **indukovaný fit** (obrázok 4.2), a to *Danielom E. Koshlandom* v roku 1958.



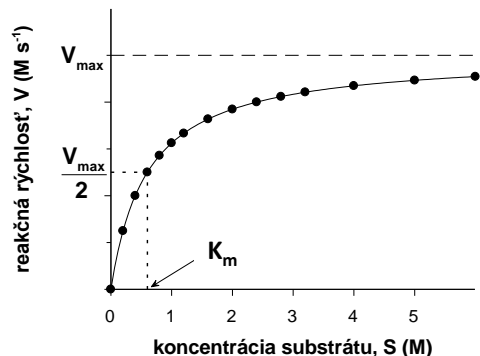
Obrázok 4.1 Schematické znázornenie aktívneho miesta ako kľúča a zámky.



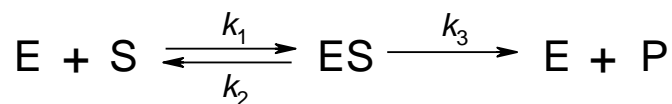
Obrázok 4.2 Schematické znázornenie dynamického rozpoznávania substrátu.

Michaelis-Mentenovej model

Pre mnohé enzýmy závisí rýchlosť katalýzy V od koncentrácie substrátu $[S]$ ako ukazuje nasledujúci graf:



Pri danej koncentrácii enzýmu je rýchlosť V takmer lineárne závislá od $[S]$, keď je $[S]$ nízka. Pri vysokej $[S]$, je V takmer nezávislá od $[S]$. V roku 1913, *Leonor Michaelis* a *Maud Menten* navrhli jednoduchý model, ktorý vysvetlil tieto kinetické charakteristiky. Podstatnou črtou ich modelu je vznik intermediárneho stavu – komplexu enzým-substrát. Tento najjednoduchší model vysvetľuje kinetické vlastnosti mnohých enzýmov:



Enzým E interaguje so substrátom S za vzniku komplexu ES s rýchlostnou konštantou k_1 . Komplex ES má dve možnosti – buď disociuje späť na enzým E a substrát S s rýchlostnou konštantou k_2 , alebo pokračuje v reakcii za vzniku produktu P s rýchlostnou konštantou k_3 . Predpokladá sa, že reakcia z ES na $E + P$ je nevratná.

Takáto reakcia je v podmienkach ustáleného stavu (*steady-state*) popísaná **Michaelis-Mentenovej rovnicou**:

$$V = V_{\text{max}} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

kde $V_{\text{max}} = k_3[E_T]$, pričom E_T je celková koncentrácia enzýmu a K_m je **Michaelisova konštantá**, pre ktorú platí: $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$.

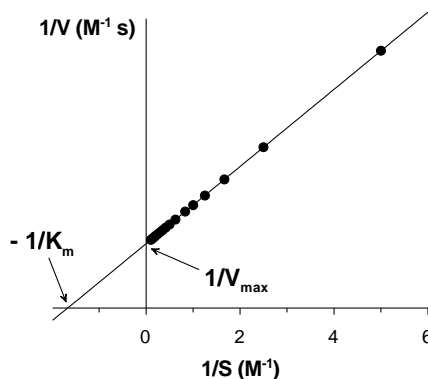
Táto rovnica vysvetľuje kinetické údaje z predchádzajúceho grafu. Pri veľmi malej koncentrácii substrátu, keď je $[S]$ oveľa menšia ako K_m , $V = [S]V_{\text{max}}/K_m$; to znamená, že rýchlosť je priamoúmerná koncentrácii substrátu. Pri príliš vysokej koncentrácii substrátu, keď je $[S]$ oveľa väčšia ako K_m , $V = V_{\text{max}}$; t.j. rýchlosť dosiahne maximálnu hodnotu a nezávisí od koncentrácie substrátu.

Význam hodnoty K_m je zrejmý z rovnice. Keď $[S] = K_m$, potom $V = V_{\text{max}}/2$. **Hodnota K_m je teda rovná koncentrácii substrátu, pri ktorej je reakčná rýchlosť rovná polovici maximálnej rýchlosti.**

Hodnoty K_m a V_{max} je možné určiť z experimentálne zistenej závislosti počiatkovej rýchlosti V meranej pri rôznych koncentráciách substrátu. Pre presné určenie oboch hodnôt je vhodné transformovať Michaelis-Mentenovej rovnicu na tvar, ktorý bude dávať lineárnu závislosť medzi veličinami V a $[S]$. Jedným zo spôsobov je tvar, ktorý dostaneme recipročným vyjadrením oboch strán rovnice:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Závislosť $1/V$ od $1/[S]$, nazývaná tiež **Lineweaver-Burkova závislosť**, dáva priamku, ktorá pretína os y v hodnote $1/V_{\max}$ a má smernicu K_m/V_{\max} . Priesečník s osou x je rovný $-1/K_m$.



Význam hodnôt K_m a V_{\max}

K_m nadobúda pre jednotlivé enzýmy/substráty veľmi rozdielne hodnoty (**tabuľka 4.2**). Pre väčšinu enzýmov leží hodnota K_m v intervale od 10^{-1} do 10^{-7} M. Veľkosť hodnoty K_m závisí

TABUĽKA 4.2 Hodnoty K_m pre niektoré enzýmy		
Enzým	Substrát	K_m (μM)
chymotrypsín	acetyl-L-tryptofanamid	5000
lyzozým	hexa-N-acetylglukozamín	6
β -galaktozidáza	laktóza	4000
treonín-deamináza	treonín	5000
karboanhydráza	CO_2	8000
penicilináza	benzylpenicilín	50
pyruvátdekarboxyláza	pyruvát	400
	HCO_3^-	1000
	ATP	60
arginín-tRNA-syntetáza	arginín	60
	tRNA	0,4
	ATP	300

od charakteru substrátu a vlastností prostredia – ako pH, teplota a iónová sila. Hodnota K_m má dva významy. Prvý, K_m určuje koncentráciu substrátu, pri ktorej je polovica aktívnych miest obsadená. Keď poznáme K_m , frakciu obsadených aktívnych miest substrátom, f_{ES} , môžeme vypočítať z nasledovného vzťahu:

$$f_{ES} = \frac{V}{V_{\max}} = \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Druhý význam K_m je ten, že hodnota K_m sa dá vyjadriť cez jednotlivé rýchlostné konštanty ako $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$. Uvažujme limitný prípad, pri ktorom je k_2 oveľa väčšie ako k_3 . To znamená, že disociácia komplexu ES na E a S je oveľa rýchlejšia ako tvorba E a P . V takomto prípade ($k_2 \gg k_3$):

$$K_m = \frac{k_2}{k_1}$$

Disociačná konštanta komplexu ES je daná vzťahom:

$$K_{ES} = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2}{k_1}$$

Inými slovami, K_m sa rovná disociačnej konštante komplexu ES v prípade, že k_2 je oveľa väčšia ako k_3 . Ak platí táto podmienka, potom K_m je mierou pevnosti komplexu ES : veľká hodnota K_m naznačuje slabú väzbu E a S ; nízka hodnota K_m poukazuje na pevný komplex. Treba však zdôrazniť, že K_m poukazuje na afinitu komplexu ES **iba** v prípade, že k_2 je oveľa väčšie ako k_3 .

V súvislosti s aktivitou enzýmu sa používa hodnota, ktorá **určuje množstvo molekúl substrátu, ktoré sa premenilo na produkt jedinou molekulou enzýmu za jednotku času, keď bol enzým úplne saturovaný substrátom**. Táto hodnota sa nazýva **rýchlosť premeny**, alebo podľa doslovného prekladu anglického originálu – **číslo premeny** (*turnover number*). Táto hodnota je rovná hodnote k_3 . V literatúre sa tiež označuje ako k_{cat} . Vzťah medzi maximálnou rýchlosťou V_{max} a k_3 , keď sú aktívne miesta na enzýme saturované substrátom je nasledovný:

$$V_{max} = k_3[E_T]$$

Napríklad, roztok karboanhydrázy s koncentráciou 10^{-6} M "vytvorí" 0,6 M H_2CO_3 za sekundu, keď je enzým úplne saturovaný substrátom. Hodnota k_3 sa rovná 6×10^5 s $^{-1}$. Táto hodnota je jednou z najväčších známych hodnôt k_3 . Jeden proces katalýzy v prípade karboanhydrázy trvá približne 1,7 μ s. Väčšina k_3 hodnôt známych enzýmov je v rozmedzí 1 až 10^4 s $^{-1}$ (tabuľka 4.3).

TABUĽKA 4.3 Hodnoty k_3 pre niektoré enzýmy	
Enzým	k_3 (s $^{-1}$)
karboanhydráza	600 000
3-ketosteroidizomeráza	280 000
acetylcholinesteráza	25 000
penicilináza	2 000
laktátdehydrogenáza	1 000
chymotrypsín	100
DNA-polymeráza I	15
tryptofansyntetáza	2
lyzozým	0,5

Mnoho enzýmov katalyzuje reakcie s dvoma alebo viacerými substrátmi

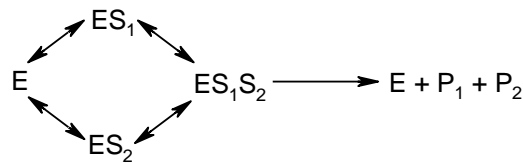
Michaelis-Mentenovej rovnica ukazuje, že rýchlosť jednoduchej enzýmovej reakcie ($S \rightarrow P$) závisí iba na koncentrácii jedného substrátu. Avšak v mnohých enzýmových reakciách sa do enzýmu viažu dva (a niekedy aj viac) rozličné substráty a zúčastňujú sa enzymatickej reakcie. Ako príklad môžeme uviesť reakciu katalyzovanú **hexokinázou**, kde sa ako substrát viažu ATP a glukóza za vzniku produktov glukóza-6-fosfát a ADP:



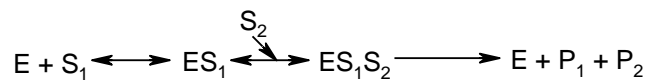
Rýchlosť takejto bisubstrátovej reakcie môže byť taktiež analyzovaná prístupom podľa Michaelisa a Mentenovej. Hexokináza má charakteristickú K_m pre každý zo substrátov.

Enzymatické reakcie s dvoma substrátmi zvyčajne zahŕňajú prenos atómu alebo funkčnej skupiny z jedného substrátu na druhý. Tieto reakcie sa môžu uskutočňovať viacerými mechanizmami. V niektorých prípadoch sú obidva substráty v istom čase naviazané do enzýmu súčasne tvoriac tak **ternárny komplex**:

- Enzymová reakcia zahŕňajúca tvorbu ternárneho komplexu:
Náhodné poradie

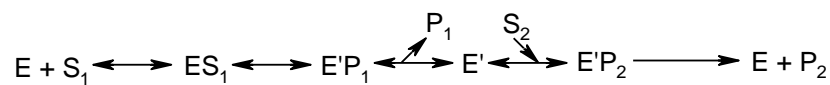


Usporiadané poradie

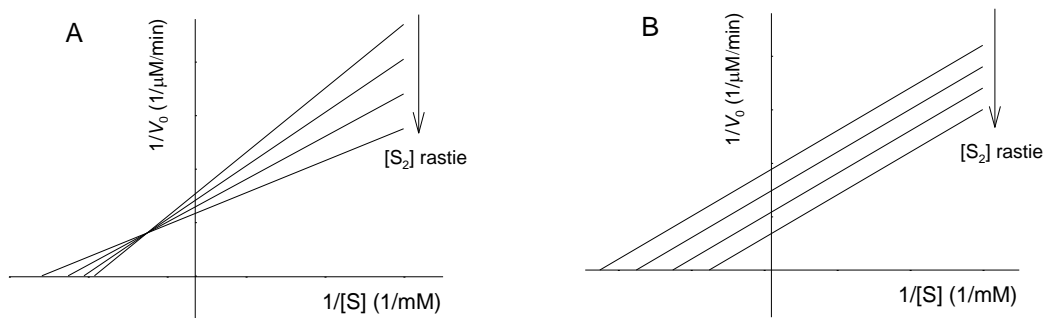


Takýto komplex môže vzniknúť naviazaním substrátov v náhodnom alebo v špecifickom poradí. Ternárny komplex sa nevytvára, keď prvý naviazaný substrát sa mení na produkt, ktorý z enzýmu disociuje pred naviazaním druhého substrátu. Príklad takéhoto mechanizmu je **ping-pongový mechanizmus**, alebo mechanizmus dvojitého nahradenia:

- Enzymová reakcia, pri ktorej sa ternárny komplex nevytvára:



Meranie reakčných kinetík často umožňuje rozlíšiť tieto dva mechanizmy.



Obrázok 4.3 Rovnovážna kinetická analýza bisubstrátových reakcií. V týchto grafoch sa $[S_1]$ mení, zatiaľ čo $[S_2]$ je konštantná. Tieto merania sa opakujú pre niekoľko hodnôt $[S_2]$, vytvárajúc tak niekoľko lineár. Vznik priesečníka poukazuje na vznik ternárneho komplexu (A); paralelné závislosti poukazujú na ping-pongový mechanizmus (B).

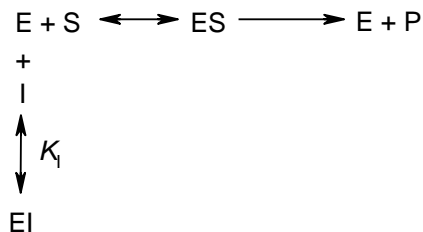
Inhibícia enzýmov

Enzýmové inhibítory sú látky, ktoré spomaľujú alebo spôsobujú zastavenie chemických reakcií. Enzýmy katalyzujú prakticky všetky bunkové procesy, preto nie je prekvapujúce, že enzýmové inhibítory patria k najdôležitejším látkam vo farmaceutickom priemysle. Napríklad acylpyrín (aspirín, acetylsalicylát) inhibuje enzým, ktorý katalyzuje prvý krok v syntéze prostaglandínov, látok, ktoré sa zúčastňujú mnohých procesov vrátane tých, ktoré produkujú pocit bolesti. Štúdium enzýmových inhibítorov tiež poskytuje dôležité informácie ohľadom enzýmového mechanizmu a pomohlo pri určení niektorých metabolických dráh. Existujú dve veľké triedy enzýmových inhibítorov: **reverzibilné** a **ireverzibilné**.

Reverzibilná inhibícia môže byť:

- kompetitívna,
- akompetitívna,
- zmiešaná.

Kompetitívny inhibítor súťaží so substrátom o aktívne miesto enzýmu. Ak inhibítor (I) obsadí aktívne miesto, bráni tak väzbe substrátu do enzýmu. Kompetitívne inhibítory sú štruktúrne často veľmi podobné substrátu a interagujú s enzýmom za vzniku komplexu EI , avšak bez nasledujúcej katalytickej reakcie:



Kompetitívna inhibícia môže byť analyzovaná kvantitatívne rovnovážnou kinetikou. V prítomnosti inhibítora, vyzerá Michaelis-Mentenovej rovnica nasledovne:

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_m + [S]}$$

kde

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

a

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Michaelis-Mentenovej rovnica pre kompetitívnu inhibíciu poukazuje na dôležitú črtu kompetitívnej inhibície. Experimentálne určená hodnota αK_m pozorovaná v prítomnosti inhibítora, sa často nazýva *apparent*, t.j. zjavná, pozorovaná, K_m .

Pretože sa inhibítor viaže reverzibilne do enzýmu, môže byť kompetitívne vytlačený substrátom zvýšením koncentrácie substrátu. Keď $[S] \gg [I]$, pravdepodobnosť, že molekula inhibítora bude viazaná do enzýmu je minimalizovaná a reakcia vykazuje normálnu hodnotu V_{\max} . Avšak hodnota $[S]$, pri ktorej $V = V_{\max}/2$, t.j. pozorovaná K_m , je zvýšená v prítomnosti inhibítora faktorom α . Tento efekt kompetitívneho inhibítora na hodnotu K_m , kombinovaný s faktom, že V_{\max} ovplyvnená nie je, charakterizuje kompetitívnu inhibíciu a je ľahko odhaliteľný pomocou Lineweaver-Burkovho vynesenia. Rovnovážna konštanta pre väzbu inhibítora, K_I , môže byť získaná z toho istého typu vynesenia:

kde

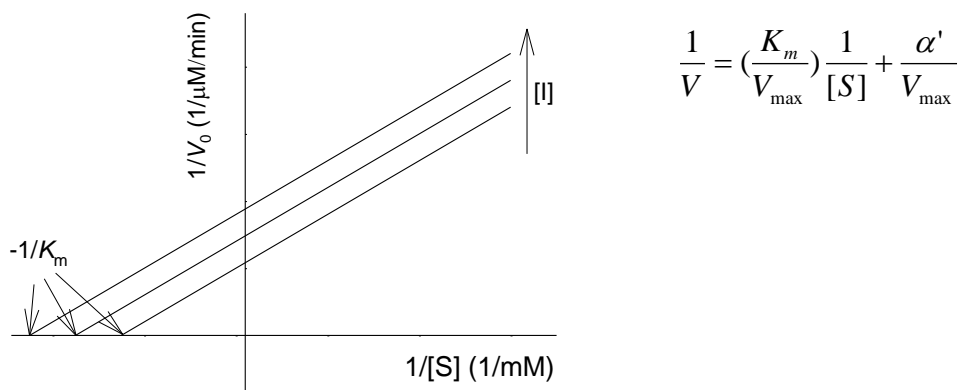
$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I'}$$

a

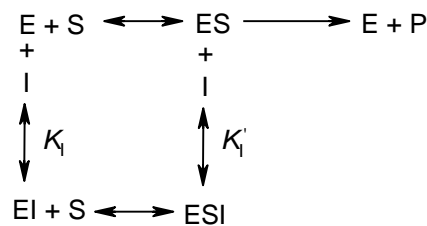
$$K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Ako vyplýva z uvedenej Michaelis-Mentenovej rovnice, pri vysokej koncentrácii substrátu sa bude hodnota V blížiť k hodnote V_{\max}/α' . Akompetitívny inhibítor preto znižuje meranú hodnotu V_{\max} . Pozorovaná hodnota K_m taktiež klesá, pretože $[S]$ potrebné na dosiahnutie $V_{\max}/2$ je znížená faktorom α' .

Lineweaver-Burkov graf v prípade akompetitívnej inhibície vyzerá nasledovne:



Zmiešaný inhibítor sa taktiež neviaže do aktívneho miesta, ale interaguje aj s E aj s komplexom ES , pričom afinita k obom z nich je rôzna:

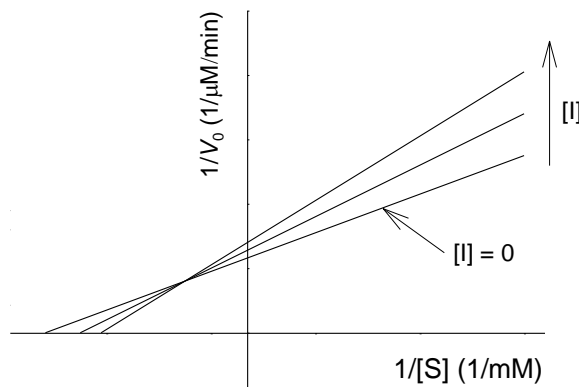


Rýchlostná rovnica popisujúca zmiešanú inhibíciu vyzerá nasledovne:

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]}$$

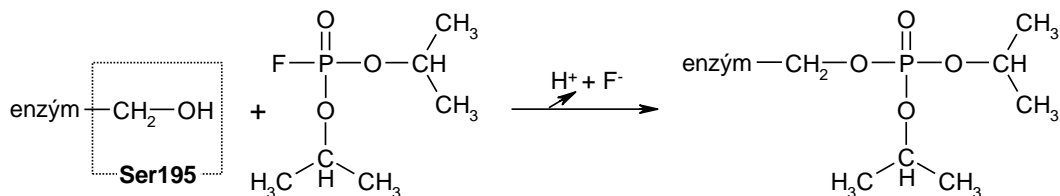
kde α a α' sú definované vyššie. Zmiešaná inhibícia zvyčajne ovplyvňuje aj K_m aj V_{\max} . Špeciálny prípad, zriedka sa vyskytujúci v praxi, keď $\alpha = \alpha'$, definuje **nekompetitívnu inhibíciu**. V tomto prípade bude ovplyvnená iba hodnota V_{\max} , ale nie hodnota K_m (použitím predchádzajúcej rovnice skúste vysvetliť prečo). Afinita nekompetitívneho inhibítora k E a ku komplexu ES je rovnaká.

Lineweaver-Burkov graf v prípade zmiešanej inhibície vyzerá nasledovne:



$$\frac{1}{V} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$

Ireverzibilné inhibítory sú tie, ktoré interagujú alebo ničia funkčnú skupinu na enzýme, ktorá je nevyhnutná pre enzýmovú aktivitu alebo vytvárajú zvlášť stabilné nekovalentné komplexy s enzýmom. Tvorba kovalentnej väzby ireverzibilného inhibítora a enzýmu je bežná. Je veľmi dôležitým nástrojom pri štúdiu reakčného mechanizmu enzýmov. Aminokyselina s kľúčovou katalytickou funkciou v aktívnom mieste môže byť niekedy identifikovaná na základe toho, ktorá aminokyselina je kovalentne modifikovaná inhibítorm. Ako príklad môžeme uviesť ireverzibilnú inhibíciu proteáz (v danom prípade chymotrypsínu) **diizopropylfluorofosfátom** (DIFP):

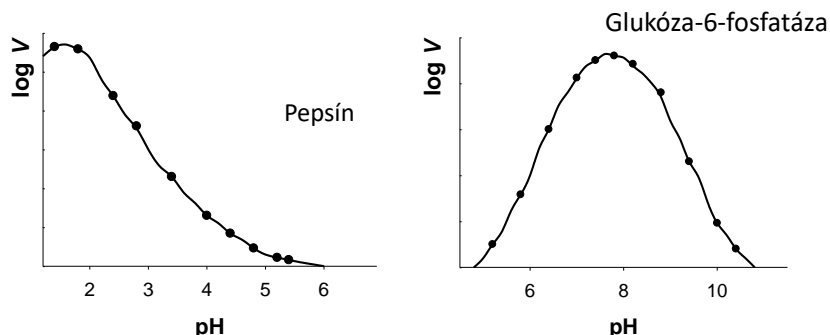


Táto inhibícia je špecifická pre proteázy v tom zmysle, že napriek tomu, že tieto enzýmy obsahujú viacero serínových aminokyselinových zvyškov, modifikovaná je výnimočne serínová hydroxylová skupina v aktívnom mieste.

Špeciálnu triedu inhibítorov tvoria **samovražedné inhibítory**. Tieto zlúčeniny sú relatívne nereaktívne, až kým sa nenaviažu do aktívneho miesta špecifického enzýmu. Samovražedný inaktivátor sa zúčastňuje na prvých krokoch normálnej enzýmovej reakcie, ale namiesto toho, aby sa transformoval na "normálny" produkt, mení sa tento inhibítor na reaktívnu zlúčeninu, ktorá ireverzibilne reaguje s enzýmom. Tieto zlúčeniny sa taktiež nazývajú **na mechanizme založené inaktivátory**, pretože využívajú normálny enzýmový reakčný mechanizmus na inaktiváciu enzýmu. Samovražedné inaktivátory hrajú centrálnu úlohu pri tvorbe nových liekov – je to moderný prístup modelovania/vytvárania vysokoaktívnych liekov založený na znalosti štruktúry substrátu a reakčného mechanizmu daného enzýmu. Dobře vytvorený samovražedný inaktivátor je špecifický pre jediný typ enzýmu a je nereaktívny, až kým sa nedostane do aktívneho miesta enzýmu – lieky založené na takomto prístupe budú mať významnú vlastnosť, že ich vedľajšie účinky budú minimalizované.

Enzýmy sú citlivé na pH hodnotu prostredia

Enzýmy majú **pH optimum** (alebo pH oblasť), pri ktorom je ich aktivita maximálna. Pri nižšom alebo vyššom pH ich aktivita klesá.



Obrázok 4.5 pH závislosť aktivity dvoch enzýmov. Tieto krivky boli zostrojené na základe meraní počiatočných rýchlostí uskutočnených v tlmivých roztokoch s rôznou hodnotou pH. pH optimum aktivity enzýmov sa vo všeobecnosti nachádza v oblastiach pH, aké má prirodzené prostredie výskytu daného enzýmu. Pepsín, ktorý hydrolyzuje peptidové väzby v proteínoch počas trávenia v žalúdku, má pH optimum okolo 1,6. pH žalúdovej šťavy je 1 až 2. Glukóza-6-fosfatáza v hepatocytoch (pečeňových bunkách), s pH optimom pri 7,8, zodpovedá za uvoľňovanie glukózy do krvi. Normálne pH v cytoplazme hepatocytov je 7,2.

To samozrejme nie je prekvapujúce, pretože bočné skupiny v aktívnom mieste s vlastnosťami slabých kyselín alebo báz majú kritickú funkciu pre aktivitu mnohých enzýmov. Odstránenie protónu z histidínového zvyšku môže napríklad eliminovať iónovú interakciu nevyhnutnú pre stabilizáciu aktívnej konformácie enzýmu. Menej bežným prípadom pH senzitivity je titrácia skupiny na substráte.

pH oblasť, v ktorej dochádza ku zmene aktivity enzýmu môže naznačiť, ktorá aminokyselina sa nachádza v aktívnom mieste. Zmena aktivity v oblasti pH 7, napríklad, poukazuje na titráciu histidínového zvyšku. Pri interpretácii pH efektu je však nevyhnutná opatrnosť. V zbalenom proteíne môže byť pK_a mnohých aminokyselín výrazne zmenená. Napríklad, blízka lokalizácia pozitívneho náboja znižuje pK_a konštantu lyzínového zvyšku a negatívny náboj ju zvyšuje. Takéto efekty môžu spôsobiť posun o 2 a viac jednotiek pH v porovnaní s pK_a hodnotou voľnej aminokyseliny. V enzýme *acetoacetátdekarboxyláza* má jeden z Lys (normálne $pK_a = 10,5$) pK_a posunutú na 6,6 v dôsledku elektrostatického efektu blízkeho pozitívneho náboja.

Použitá literatúra

- Barna K., Paščenko A. Je., Barnová E., Guzy J.: Lekárska chémia a biochémia, 3. prepracované vydanie, Košice 1989.
- Creighton T. E.: Proteins structures and molecular properties, 2nd edition, W. H. Freeman and Company, New York 1993.
- Podhradský D., Mihalovová H.: Praktické cvičenia z biochémie, Košice 1989.
- Stryer L.: Biochemistry, 8th edition, W.H. Freeman and Company, New York 2015.
- Vodrážka Z.: Biochemie, 2. vydanie, Academia, Praha 2002.

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 nastavcom, 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.

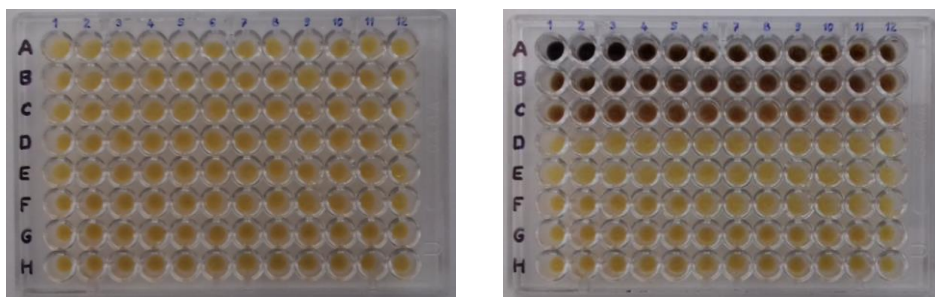
TÉMA	ENZÝMY
Úloha 26:	Stanovenie aktivity katalázy.
Princíp:	<p><i>Kataláza (EC 1.11.1.6) je všeobecne rozšírený enzým, ktorý katalyzuje rozklad peroxidu vodíka podľa rovnice:</i></p> $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$ <p><i>Kataláza je tetramér, t.j. skladá sa zo štyroch polypeptidových reťazcov, pričom každý z nich obsahuje jeden hem ($M_r = 240\,000$ g/mol). Peroxid vodíka, ktorý môže vznikáť v organizme pri pôsobení niektorých flavínových dehydrogenáz, je nebezpečný pre bunkové štruktúry a kataláza pôsobí ako "detoxikačný enzým". Samotný enzým sa rozkladá nadbytkom substrátu. Preto sa stanovenie aktivity katalázy robí pri 0 °C, aby sa zabránilo jej rýchlemu rozkladu.</i></p> <p><i>Číslo premeny (angl. turnover number) tohto enzýmu je jedno z najvyšších vôbec; udáva sa hodnota 5×10^5 s⁻¹. Aktivita katalázy sa vyjadruje prostredníctvom rýchlosti monomolekulovej reakcie rozkladu peroxidu vodíka. Pretože sa rýchlosť reakcie pre rozklad enzýmu substrátom rýchlo mení, stanoví sa závislosť rýchlostnej konštanty reakcie prvého poriadku a extrapoluje sa na čas $t = 0$ min. Získaná hodnota rýchlostnej konštanty vynásobená koncentráciou peroxidu vodíka v čase $t = 0$ min predstavuje počiatočnú rýchlosť reakcie. Priebeh reakcie sa sleduje manganometrickým stanovením nerozloženého peroxidu vodíka vo vzorkách, odobraných v pravidelných intervaloch z inkubačnej zmesi, podľa rovnice:</i></p> $5 H_2O_2 + 2 KMnO_4 + 3 H_2SO_4 \rightarrow 2 MnSO_4 + K_2SO_4 + 5 O_2 + 8 H_2O$
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. roztok peroxidu vodíka (zmiešať 1 ml 30 % H_2O_2 so 6 ml 0,1 M fosforečnanového tlmivého roztoku s pH 6,8 a doplniť na objem 100 ml destilovanou vodou) 2. 0,1 M fosforečnanový tlmivý roztok s pH 6,8 3. 1 M roztok kyseliny sírovej 4. 0,0025 M roztok manganistanu draselného 5. roztok katalázy (riedenie: 0,1 ml/100 ml, aktivita pôvodného neriedeného roztoku enzýmu: 450 450 U/ml, pričom 1 g enzýmu = 111 ml, aktivita ~ 50 000 U/mg) 6. 0,1 % roztok síranu manganatého (pred začiatkom titrácie manganistanom pridávame 1 – 3 kvapky. Reakcia uvedená v princípe je autokatalyzovaná Mn^{2+} iónmi, a preto je prítomnosť malého množstva Mn^{2+} iónov v roztoku pred titráciou užitočná.)
Materiál:	odmerná banka s objemom 50 ml, vodný kúpeľ s kúskami ľadu, sklenené pipety s nadstavcom, titračné banky širokohrdlé (6 ks), byreta s objemom 25 ml
Postup:	<p>Do 50 ml odmernej banky napipetujeme 2,5 ml roztoku peroxidu vodíka (substrát), 3,3 ml fosforečnanového tlmivého roztoku s pH 6,8 a doplníme destilovanou vodou po značku. Roztok dobre premiešame, prelejeme do titračnej banky a vložíme do kúpeľa, ktorý obsahuje vodu a kúsky ľadu. Súčasne vložíme do kúpeľa aj skúmavku s pripraveným, vhodne zriedeným roztokom katalázy (enzým). Inkubujeme 10 min. Medzitým pipetujeme do ďalších 5 titračných baniek po 5 ml 1 M H_2SO_4 (zastaví reakciu) a pridáme po 3 kvapky $MnSO_4$.</p> <p>Pre vyhodnotenie výsledkov je dôležité získať informáciu o koncentrácii H_2O_2 na začiatku reakcie, teda v čase $t = 0$ min. Vzhľadom na to, že pridanie enzýmu k roztoku H_2O_2 okamžite spúšťa reakciu, pre správne určenie koncentrá-</p>

	<p>cie H_2O_2 v čase $t = 0$ min postupujeme tak, že do prvej titračnej banky obsahujúcej H_2SO_4 a MnSO_4 pridáme 5 ml roztoku H_2O_2 bez enzýmu. Až potom do zvyšných 45 ml inkubovaného roztoku H_2O_2 rýchlo pripipetujeme 1 ml enzýmu, reakčnú zmes premiešame a zaznamenáme čas. Od tejto chvíle začneme merať čas a v intervaloch 3, 6, 9 a 12 minút odoberáme z reakčnej zmesi po 5 ml, ktoré pridávame postupne do zvyšných štyroch titračných baniek s H_2SO_4 a MnSO_4. Nakoniec všetky banky titrujeme roztokom KMnO_4 do rovnakého svetloružového sfarbenia a zaznamenávame príslušné spotreby.</p>
Vyhodnotenie:	<p>Titraciou reakčných zmesí roztokom KMnO_4 stanovíme koncentráciu enzýmom nerozloženého H_2O_2 v časoch 0, 3, 6, 9 a 12 minút. Pre výpočet koncentrácie použijeme nasledujúcu rovnicu:</p> $\frac{c(\text{H}_2\text{O}_2) \cdot V(\text{H}_2\text{O}_2)}{5} = \frac{c(\text{KMnO}_4) \cdot V(\text{KMnO}_4)}{2}$ <p>kde $V(\text{H}_2\text{O}_2) = 5$ ml, $c(\text{KMnO}_4) = 0,0025$ M a $V(\text{KMnO}_4)$ je spotrebovaný KMnO_4 v ml.</p> <p>Rýchlostnú konštantu (k_t) reakcie prvého poriadku vypočítame podľa vzťahu:</p> $k_t = \frac{2,303}{t} \log \frac{c(\text{H}_2\text{O}_2)_{t=0}}{c(\text{H}_2\text{O}_2)_t}$ <p>kde t je čas v minútach, $c(\text{H}_2\text{O}_2)_{t=0}$ je koncentrácia substrátu v čase $t = 0$ min a $c(\text{H}_2\text{O}_2)_t$ je aktuálne množstvo substrátu v čase t (3, 6, 9, 12 min).</p> <p>Získané hodnoty k_t vynesieme do grafu oproti času a priesečník lineárnej závislosti s osou y odpovedá hodnote k v čase $t = 0$ min (k_0). Vynásobením hodnoty k_0 s hodnotou koncentrácie H_2O_2 v čase $t = 0$ min získame počiatočnú rýchlosť reakcie v M/min. Túto hodnotu vynásobíme objemom reakčnej zmesi v litroch, t.j. 0,046 (45 ml roztoku H_2O_2 + 1 ml enzýmu), čím získame počet molov H_2O_2, ktoré sa rozloží za 1 min v 46 ml reakčnej zmesi. Po vynásobení číslom 10^6 (premena z mol na μmol) a 10^3 (riedenie enzýmu) získame aktivitu katalázy v jednotkách $\mu\text{mol}/\text{min}$ (U) na 1 ml pôvodného neriedeného roztoku enzýmu.</p>
Záver:	Uvedieme hodnotu aktivity katalázy pri danej teplote a pH (0 °C, pH 6,8).

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"> malý kúsok (0,5 g) suchého tvarohu roztok pepsínu (2 % v 0,1 M kyseline chlorovodíkovej) 1 % roztok hydroxidu sodného 0,1 M roztok kyseliny chlorovodíkovej biuretové činidlo 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.				

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 0,02 M roztok jódu 					
Materiál:	sklenené pipety s nastavcom, skúmavky, stojan na skúmavky, stopky, 96-jamkové platničky, mikropipety, sklenené trubičky na odoberanie vzoriek, centrifúga, centrifugačné skúmavky, odmerný valec s objemom 25 ml, trepačka					
Postup:	<p>Príprava roztoku α-amylázy zo slín</p> <p>Do centrifugačnej skúmavky dáme vlastné sliny a necháme centrifugovať 10 min pri 4000 ot/min (1500 g). Do kadičky odpipetujeme 2 ml supernatantu (vrchnú vrstvu zachytíme o stenu centrifugačnej skúmavky sklenenou tyčinkou), doplníme 8 ml destilovanej vody na celkový objem 10 ml (5-násobné zriedenie) a premiešame. Takto pripravený roztok enzýmu použijeme v ďalších úlohách.</p> <p>Určenie optimálneho pH pre štiepenie škrobu α-amylázou</p> <p>Do označených skúmaviiek 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 1 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</p>						

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.



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.

Analogicky postupujeme aj s roztokmi v ďalších skúmavkách (vždy po jednej). V prípade príliš rýchlej reakcie pri pH 5,8 (celkový čas kratší ako jedna minúta) bude potrebné roztok α -amylázy zriediť.

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:	<ol style="list-style-type: none"> 1 % roztoky: sacharózy, škrobu a glukózy roztok sacharózy (vyizolovaná v úlohe 21) roztok α-amylázy (vyizolovaná v úlohe 28) Benediktího 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 rozpustiteľného 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 (zriedená) [ml]	– 0,5 – 0,5 – – – –
	premiešať, 15 min inkubovať pri laboratórnej teplote
Benediktího 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.

TÉMA	ENZÝMY
Úloha 30:	Vplyv koncentrácie substrátu na počiatočnú rýchlosť reakcie: určenie V_{max} a K_m pre štiepenie močoviny ureázou
Princíp:	<p>Enzým ureáza (EC 3.5.1.5, $M_r = 480\,000$ g/mol) katalyzuje hydrolytický rozklad močoviny. Vznikajúci amoniak vytvára vo vodnom prostredí amónne katióny, čo zvyšuje alkalitu roztoku:</p> $\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2 + 3 \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons{\text{ureáza}} \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_4^+ + 2 \text{OH}^-$ <p>Ak sa stitujú vznikajúce hydroxylové anióny kyselinou, možno po určitom čase pôsobenia enzýmu stanoviť začiatočnú rýchlosť reakcie. Pretože rýchlosť enzymovej reakcie značne závisí od koncentrácie vodíkových iónov, je potrebné pracovať pri konštantnom pH. Stálosť pH sa dosiahne tlmivým roztokom a titrovaním nadbytočného amoniaku v priebehu reakcie na indikátor s pH prechodom okolo 6,8 (pH optimum enzýmu). Vo vhodnej dobe sa reakcia zastaví prídavkom roztoku ortuťnatých iónov, ktoré inhibujú enzým. Aby sa zabránilo vyzrážaniu bielkovín ortuťnatými iónmi, a tým zakaleniu titrovaného roztoku, pridávajú sa ortuťnaté ióny v prítomnosti chloridu amónneho. Titruje sa na indikátor prechodu 4,4 až 5,4 (pH roztoku chloridu amónneho). Rýchlosť reakcie katalyzovanej ureázou so stúpajúcou koncentráciou močoviny najskôr stúpa, pri vysokých koncentráciách však dochádza k poklesu reakčnej rýchlosti vplyvom inhibície enzýmu substrátom. Enzýmová reakcia sa robí pri laboratórnej teplote; je však potrebné vylúčiť akúkoľvek možnosť zmeny teploty roztoku (napr. zahriatie dotykom ruky).</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1,44 % roztok močoviny 2,5 % roztok močoviny roztok chloridu ortuťnatého s chloridom amónnym (0,2 % roztok HgCl_2 zmiešať s rovnakým objemom nasýteného roztoku NH_4Cl. Pri pipetovaní používať bezpečnostnú pipetu s guľôčkou nad značkou!) roztok enzýmu (1 g čistenej ureázy – 150 jednotiek na 1 g – rozotrieť s malým množstvom rovnakých dielov glycerolu a 0,1 M fosforečnanového roztoku s pH 6,8. Doplniť zmesou glycerolu a fosforečnanového roztoku (1:1) do 100 ml a sfiltrovať cez skladaný filter. Roztok uchovávať v chladničke.) 0,04 % roztok brómtymolovej modrej v etanole (pK 7,1; oblasť farebnej zmeny pH: 6,0 – 7,6) 0,02 % roztok metylčervene v 50 % etanole (pK 4,95; oblasť farebnej zmeny pH: 4,2 – 6,3) 0,04 % roztok brómkrezolovej zelenej v etanole (pK 4,68; oblasť farebnej zmeny pH: 3,8 – 5,4) 0,03 M roztok kyseliny chlorovodíkovej
Materiál:	byreta s objemom 25 ml, titračné banky (7 ks), sklenené pipety s nastavcom
Postup:	Najskôr byretu naplníme 0,03 M kyselinou chlorovodíkovou. Potom do troch titračných baniek označených S ₁ (slepý pokus na prvé farebné porovnanie), S ₂ (slepý pokus na druhé farebné porovnanie) a V (vzorka) napipetujeme po 2 ml roztoku ureázy a pridáme po 10 kvapiek brómtymolovej modrej. Do titračných baniek S ₁ a S ₂ pridáme po 10 ml destilovanej vody a obsah premiešame. Potom do titračnej banky V rýchlo pripipetujeme 10 ml 1,44 % roztoku močoviny, obsah premiešame a súčasne zaznamenáme čas. Keďže sa obsah titračnej banky

<p>V v priebehu reakcie farbí na modro (dochádza k zvyšovaniu pH vznikajúcimi amóniovými kationmi), pH udržiavame konštantné dotitrovaním pomocou HCl za stáleho miešania tak, aby obidva roztoky (S₁ a V) mali rovnaké svetlozelené sfarbenie. Presne po 6 minútach čo najrýchlejšie pripipetujeme do titračnej banky V 1 ml roztoku chloridu ortuťnatého, čím zastavíme enzýmovú reakciu. Zaznamenáme spotrebu HCl počas enzýmovej reakcie (spotreba v₁). Potom pridáme ten istý objem chloridu ortuťnatého do banky S₂. Do oboch baniek ďalej prikvapneme po 9 kvapiek metylčervene a 6 kvapiek brómkrezolovej zelenej a obsah banky S₂ titrujeme do červeného sfarbenia. Odčítame spotrebu (spotreba s) a pokračujeme v titracii obsahu banky V do rovnakého červeného sfarbenia (spotreba v₂).</p> <p>Vyššie uvedený postup je stručne načrtnutý v nasledujúcej tabuľke.</p>					
TABUĽKA 4.7		S₁	S₂	V	poznámky k V
ureáza	[ml]	2	2	2	
brómtymolová modrá		10 kv.	10 kv.	10 kv.	
destilovaná H ₂ O	[ml]	10	10	–	
1,44 % močovina	[ml]	–	–	10	rýchlo pripipetovať, zamiešať a zaznamenať čas
				titrovať 6 minút na svetlozelené sfarbenie v S₁	zaznamenať spotrebu v₁
HgCl ₂	[ml]	–	1	1	rýchlo pripipetovať po 6 minútach
metylčerveň		–	9 kv.	9 kv.	
brómkrezolová zelená		–	6 kv.	6 kv.	
			titrovať do červeného sfarbenia	titrovať na červené sfarbenie v S₂	zaznamenať spotrebu v₂
			zaznamenať spotrebu s		
<p>Množstvo rozštiepenej močoviny je úmerné objemu spotrebovanej HCl:</p> $V_{HCl} = v_1 + v_2 - s \quad (1)$ <p>Hodnota V_{HCl} pre 1,44 % močovinu má byť v rozmedzí 3,5 – 5,5 ml. Ak je vyššia, reakciu necháme prebiehať len 3 minúty. Naopak, ak je nižšia, reakciu necháme prebiehať 12 minút.</p> <p>Rovnakým spôsobom uskutočníme sériu stanovení s roztokmi močoviny s koncentraciami 2,5 %; 2,0 %; 1,0 %; 0,72 %; 0,36 %; 0,18 % a 0,09 %. Hodnota V_{HCl} pri týchto koncentráciách už môže byť mimo spomínaný rozsah 3,5 – 5,5 ml. Slepé pokusy (S₁ a S₂) slúžia pre farebné porovnanie aj pri ďalších koncentráciách močoviny (nie je nutné opakovať ich pre každú koncentráciu osobitne).</p>					
Vyhodnotenie:	<p>Výpočet koncentrácie ureázou rozštiepenej močoviny Koncentráciu rozštiepenej močoviny vypočítame podľa vzťahu:</p> $c_{močovina} = \frac{c_{OH^-}}{2} = \frac{1}{2} \cdot \frac{c_{HCl} V_{HCl}}{V_{OH^-}} \quad (2)$ <p>kde $c_{HCl} = 0,03 \text{ M}$, $V_{OH^-} = 10 \text{ ml}$ a V_{HCl} predstavuje objem spotrebovanej HCl,</p>				

vyčíslený zo vzťahu (1).

Počiatočnú rýchlosť reakcie (v) vypočítame ako podiel koncentrácie rozštiepenej močoviny a času:

$$v = \frac{c_{\text{močovina}}}{t} \quad (3)$$

kde $t = 6$ min, resp. 3 alebo 12 min.

Príklad výpočtu molárnej koncentrácie 2,5 % močoviny

$$w = 2,5 \text{ g}/100 \text{ ml} = 25 \text{ g}/\text{dm}^3$$

$$M_r(\text{močovina}) = 60,1 \text{ g}/\text{mol}$$

$$c_{2,5\%} = \frac{w}{M_r} = \frac{25 \text{ g}/\text{dm}^3}{60,1 \text{ g}/\text{mol}} = 0,42 \text{ M}$$

Určenie V_{\max} a K_m pre štiepenie močoviny ureázou

Z Michaelisovej teórie je možné odvodiť základnú kinetickú rovnicu pre enzýmové reakcie, **rovniciu Michaelisa a Mentenovej**:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

kde v je počiatočná rýchlosť enzýmovej reakcie pri danej koncentrácii substrátu S ,

V_{\max} je maximálna rýchlosť, akou môže reakcia prebiehať pri danej koncentrácii enzýmu a

K_m je Michaelisova konštanta, ktorá je mierou afinity enzýmu k substrátu.

Ak v rovnici (4) dosadíme $v = \frac{1}{2} V_{\max}$, získame vzťah:

$$K_m = S \quad (5)$$

z ktorého vyplýva, že K_m má rozmer koncentrácie ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, resp. M) a rovná sa takej koncentrácii substrátu, pri ktorej sa počiatočná rýchlosť reakcie rovná práve polovici maximálnej rýchlosti. Týmto spôsobom možno vypočítať Michaelisovu konštantu z merania reakčnej rýchlosti pri rôznych koncentráciách substrátu. Problematické je určenie konštanty V_{\max} , pretože mnoho enzýmov je inhibovaných koncentraciou substrátu, takže teoretickú hodnotu V_{\max} prakticky vôbec nemožno dosiahnuť. Preto bolo navrhnutých niekoľko iných spôsobov stanovenia konštanty, z ktorých najbežnejšia je metóda podľa **Lineweavera** a **Burka**, ktorá vychádza z prevrátenej formy rovnice (4):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (6)$$

Závislosť $\frac{1}{v}$ od $\frac{1}{[S]}$ je lineárna, preto ak sa nanesú výsledky uvedenej série meraní v tomto súradnicovom systéme a získanými bodmi sa preloží priamka, potom úsek na osi $\frac{1}{v}$ sa rovná $\frac{1}{V_{\max}}$ a úsek na osi $\frac{1}{[S]}$ sa rovná $-\frac{1}{K_m}$.

Recipročné hodnoty rýchlosti ($\frac{1}{v}$; vid' rovnica 3) vynesieme do grafu oproti recipročným hodnotám pôvodnej koncentrácie močoviny ($\frac{1}{[S]}$; vid' vzorový

	výpočet molárnej koncentrácie 2,5 % močoviny). Zistíme priesečníky priamky s osami x a y a vypočítame hodnoty V_{\max} a K_m .
Záver:	Uvedieme hodnoty V_{\max} a K_m pre štiepenie močoviny ureázou pri daných podmienkach (laboratórna teplota, neutrálne pH).

5 NUKLEOVÉ KYSELINY

Nukleové kyseliny určujú genetické vlastnosti živej hmoty, ovplyvňujú jej organizáciu a reprodukciu. Predstavujú látku, ktorá nesie informáciu pre vznik a priebeh všetkých životných procesov, preto stoja v hierarchii látok potrebných pre existenciu živej hmoty najvyššie.

Existujú dve triedy nukleových kyselín, ktoré delíme podľa sacharidovej zložky mononukleotidov na: deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a ribonukleové kyseliny (RNA).

DNA je nositeľkou dedičnosti vo všetkých bunkových formách života a v mnohých vírusoch, pričom plní dve funkcie:

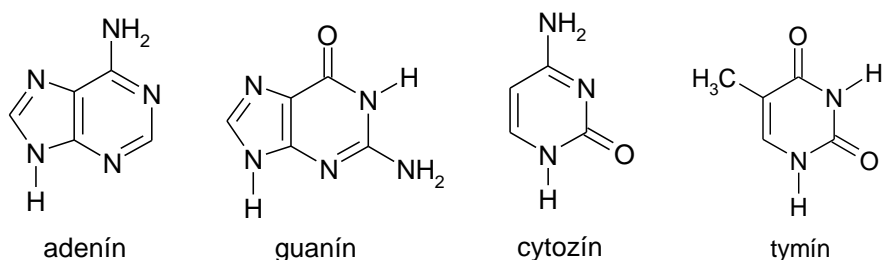
- riadi vlastnú replikáciu počas delenia bunky,
- riadi transkripciu za vzniku komplementárnych molekúl RNA.

RNA má viacero biologických funkcií:

- mediátorová RNA (mRNA) riadi ribozomálnu syntézu polypeptidov (translácia),
- ribozómová RNA (rRNA) má štruktúrnu a funkčnú úlohu,
- transferová RNA (tRNA) prenáša aminokyseliny na ribozóm počas syntézy proteínov,
- niektoré RNA sa spájajú so špecifickými proteínmi do ribonukleoproteínov, ktoré sa potom zúčastňujú posttranskripčných úprav iných RNA,
- v mnohých vírusoch je RNA nositeľkou genetickej informácie namiesto DNA (hovoríme o tzv. RNA vírusoch).

Zloženie a štruktúra DNA

Molekula **DNA** sa skladá zo štyroch báz, a to **adenínu (A)**, **guanínu (G)**, **cytozínu (C)** a **tymínu (T)**, ďalej z **2-deoxyribózy** a **kyseliny fosforečnej**. Okrem štyroch základných báz môže DNA obsahovať aj takzvané minoritné bázy ako sú napríklad 5-metylcytosín, 5-hydroxymetyluracil a N-6-metylguanín. Molekula DNA obsahuje rovnaký počet adenínových a tymínových báz (A–T) a tak isto rovnaký počet guanínových a cytozínových báz (G–C). Tieto pravidlá sú známe ako Chargaffove pravidlá, ktoré v roku 1949 popísal Erwin Chargaff.

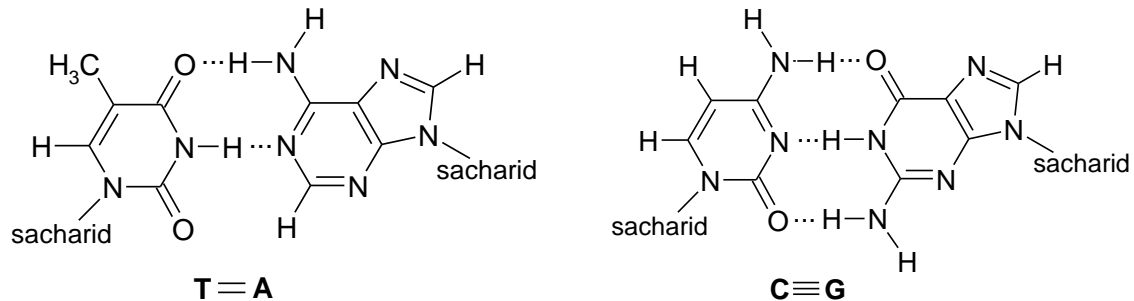


Molekula DNA tak ako každá makromolekula, je charakterizovaná okrem primárnej štruktúry aj sekundárnou a terciárnou štruktúrou. Určenie tejto štruktúry DNA *Jamesom Watsonom* a *Francisom Crickom* s využitím údajov röntgenovej analýzy uskutočnenej *Rosalindou Franklin* a *Maurice Wilkinsom* je často označované ako zrod modernej molekulovej biológie.

Watson-Crickova štruktúra B-DNA má tieto hlavné vlastnosti:

1. Skladá sa z dvoch polynukleotidových reťazcov, vinúcich sa okolo spoločnej osi v smere pohybu hodinových ručičiek a tvoria tak pravotočivú dvojzávitnicu (*double helix*) o priemere asi 2 nm. Tieto dva reťazce majú opačný smer a vinú sa jeden okolo druhého. Bázy vytvárajú jadro dvojzávitnice a ich fosfosacharidové reťazce sa vinú po okraji.
2. Roviny báz sú takmer kolmé na os dvojzávitnice. Každá báza je spojená vodíkovými mostíkmi s bázou protiľahlého reťazca za vzniku rovinného páru báz.
3. Ideálna dvojzávitnica B-DNA má 10,6 párov báz na závit (oblúk dvojzávitnice 36° na jeden pár) a stúpanie závitú dvojzávitnice 3,46 nm.

Vodíkové väzby, ktoré stabilizujú takúto štruktúru sa môžu vytvárať vždy len medzi určitými bázami, a to medzi adenínom a tymínom a medzi guanínom a cytozínom. Dvojica A–T sa páruje dvoma vodíkovými väzbami a dvojica G–C troma vodíkovými väzbami. Sekvencia v jednom reťazci dvojzávitnice je komplementárna (doplnková) k sekvencii v druhom reťazci dvojzávitnice, to znamená, že báza jedného reťazca sa môže párovať len s takou bázou, s ktorou môže vytvoriť vodíkové väzby (A=T a G≡C, **obrázok 5.1**).

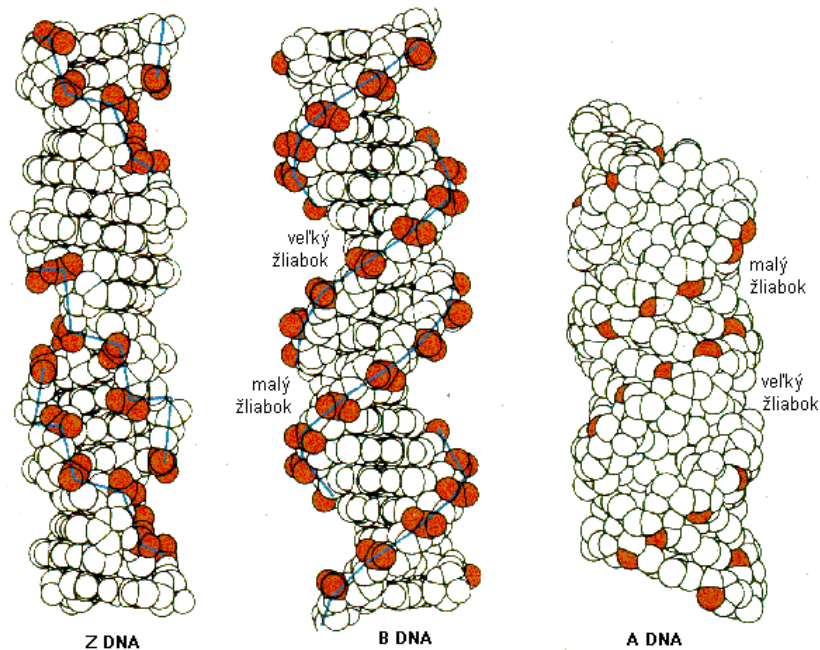


Obrázok 5.1 Vznik vodíkových väzieb medzi bázami v molekule DNA.

Párovanie báz, pri ktorom vznikajú dve vodíkové väzby medzi adenínom a tymínom a tri vodíkové väzby medzi guanínom a cytozínom je jedným z faktorov, ktoré vplyvajú na stabilitu molekuly DNA. Okrem vodíkových väzieb, dvojzávitnicu DNA stabilizujú i $\pi - \pi$ elektrónové interakcie báz, ktoré závisia od vzájomného prekrytia kruhov (*stacking interactions*). Ďalšími stabilizačnými faktormi sú:

- van der Waalsove sily medzi susednými bázami;
- záporne nabitú molekulu kyslíka, ktoré vytvárajú vodíkové väzby s molekulami vody alebo s histónmi;
- špecifické enzýmy a regulačné proteíny, ktoré sa pohybujú v širokých a úzkych žliabkoch DNA;
- superhelixy, ktoré vytvárajú molekuly DNA.

Dvojzávitnice DNA existujú vo viacerých formách, z ktorých sú najznámejšie tieto tri: **A-DNA**, **B-DNA** (obe sú pravotočivé) a **Z-DNA** (ľavotočivá). Dvojzávitnica typu B (s vertikálnym rozostúpením 3,4 nm medzi nukleotidovými bázovými rovinami a s 10,5 spárovanými bázami na jedno otočenie) je vo vodnom prostredí stabilnejšia ako typ A, preto sa DNA v bunkách vyskytuje prevažne ako B forma (väčšina úsekov jednej DNA je ako B forma, niektoré úseky môžu mať aj štruktúru A formy alebo štruktúru ľavotočivej Z formy). Pri znížení obsahu vody na 75 % (vysoká koncentrácia solí a nízky stupeň hydratácie), prechádza B forma do konformačného usporiadania A. Túto formu charakterizuje pravotočivá dvojzávitnica s priemerom 2,55 nm, v ktorej majú nukleotidové bázové roviny rozostúpenie 2,46 nm s 11 spárovanými bázami na jedno otočenie. Z-DNA je ľavotočivá dvojzávitnica s priemerom 1,84 nm s rozostúpením bázových rovín 4,56 nm, na ktorý pripadá 12 párov báz. Nukleové kyseliny sú za fyziologických podmienok silne nabitú polyanióny s distribúciou jedného záporného náboja na fosfát. V nukleozóme je iba polovica DNA náboja neutralizovaná kladne nabitými nábojmi histónových proteínov. Veľký podiel na neutralizácii DNA, a tým aj stabilizácii má hydratácia a zložky intracelulárneho prostredia, z ktorých dominantné postavenie majú kationy Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ .



Obrázok 5.2 Typy dvojzávitnicovej molekuly DNA: **Z**, **B** a **A**.

Dvojzávitnica DNA sa môže vyskytovať ako:

1. **lineárna molekula** – dvojreťazcová DNA s voľnými koncami 5' a 3'.
2. **kruhovú molekula** – spojená dvojreťazcová DNA bez voľných koncov. Kruhovú molekula môže prejsť do superhelikálnej konformácie. Touto konformáciou rozumieme zvinutie DNA v priestore. DNA nevyznačujúca sa superhelikálnym vnutím sa označuje ako relaxovaná.
 - **kovalentne uzavretá kružnica (ccc)** – dvojzávitnicová DNA, ktorá nemá voľné konce ani zlom v reťazcoch. Môže sa vyskytovať v superhelikálnej alebo relaxovanej forme.
 - **otvorená kružnica (oc)** – relaxovaná dvojzávitnica má aspoň jeden zlom v jednom z reťazcov.

Kruhovú molekula DNA je typická pre plazmidovú, mitochondriálnu a chloroplastovú DNA, a tiež je prítomná v prokaryotických bunkách, kde tvorí genóm mnohých vírusov a baktérií. **cccDNA** sa odlišuje od lineárnej formy tým, že sa v nej môže indukovať superhelikálne pnutie a je často označovaná aj ako **superhelikálna DNA (scDNA)**. Superhelikálna DNA má v porovnaní s relaxovanou formou (cccDNA) stav s vyššou termodynamickou energiou, ktorá je súčtom energetických príspevkov potrebných na ohyb a priestorové stáčanie molekuly. Superhelikálne vnutie vedie k zvýšeniu reaktivity DNA s proteínmi alebo s inými molekulami, ktoré interagujú s DNA.

Topológia superhelikálnej DNA

Topologické izoméry sú molekuly superhelikálnej DNA, ktoré sa líšia celkovým číslom vnutia **Lk**. Pri superhelikálnom usporiadaní môže os dvojzávitnice vytvárať ľavotočivé alebo pravotočivé závitky. Superhelikálna DNA môže mať dve základné podoby, ktoré sú z topologického hľadiska ekvivalentné a môžu medzi sebou navzájom prechádzať. Sú to:

- pravotočivý, ľavotočivý solenoid,
- pravotočivá, ľavotočivá dvojité nadzávitnica (superhelix).

Kruhovú molekuly a ich topológiu je možné charakterizovať pomocou topologických parametrov:

- **Tw** (twisting number) udáva počet otočení jedného reťazca okolo osi dvojzávitnice

- **Wr** (writhing number) udáva počet prekrížení jedného reťazca druhým v priestore. Hodnoty čísel Wr a Tw nemusia byť celočíselné a nie vždy sa dajú presne určiť.
- **Lk** (linking number) – celkové číslo vinutia. Nadobúda celočíselné hodnoty pre absolútny počet helikálnych otáčok cccDNA. Z toho vyplýva, že celkový počet závitov cccDNA sa nemôže meniť a akákoľvek zmena v počte otáčok v rámci molekuly musí byť vykompenzovaná zmenou počtu superhelikálnych otáčok, takže platí:

$$Lk = Tw + Wr \quad \text{alebo} \quad \Delta Lk = \Delta Tw + \Delta Wr.$$

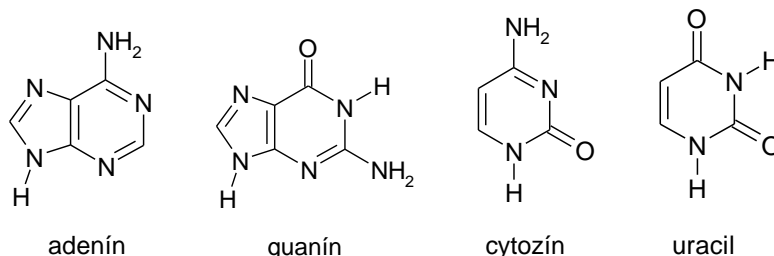
Tvorbu superhelixov, ale aj iné interakcie molekúl DNA reguluje osobitná skupina enzýmov, ktoré sa nazývajú **topoizomerázy**. Z viacerých tried topoizomeráz sú najlepšie preštudované topoizomerázy typu I a II, ktoré sú označené podľa počtu polynukleotidových reťazcov, ktoré štiepia. V závislosti od topologických vlastností ich môžeme rozdeliť do dvoch skupín:

- 1. topoizomerázy I:** premiestňujú jeden neporušený reťazec cez zlom protiláhlého reťazca v dvojzávitnici. Týmto príspevom sa mení superhelikálne vinutie kruhových molekúl o násobky 1.
- 2. topoizomerázy II:** premiestňujú neporušenú dvojzávitnicu DNA cez zlomy oboch reťazcov protiláhle dvojzávitnice. Týmto príspevom sa mení superhelikálne vinutie kruhových molekúl o násobky 2.

Topoizomerázy III: z hľadiska mechanizmu patria medzi topoizomerázy typu I. **Topoizomerázy IV:** spolu s gyrázou sa zaraďujú medzi topoizomerázy typu II. **Reverzná gyráza:** patrí medzi atypické topoizomerázy, prítomné v termofilných a hypertermofilných organizmoch. Základná funkcia katalyzovaná týmto enzýmom *in vitro* je produkcia pozitívnych superhelikálnych otáčok v cccDNA, v termodynamicky nevýhodnej reakcii, riadenej ATP. Prítomnosť pozitívneho superhelikálneho vinutia stabilizuje dvojzávitnicu pri vysokých teplotách.

Zloženie a štruktúra RNA

Molekula RNA sa tak isto ako DNA skladá zo štyroch báz, a to **adenínu (A)**, **guanínu (G)**, **cytozínu (C)** a **uracilu (U)**, sacharidovej zložky **ribózy** a **kyseliny fosforečnej**. Rovnako ako v molekule DNA sa i v molekule RNA nachádzajú minoritné bázy, ktorých je v molekule RNA viac ako v molekule DNA. Pre molekuly RNA neplatia Chargaffove pravidlá.

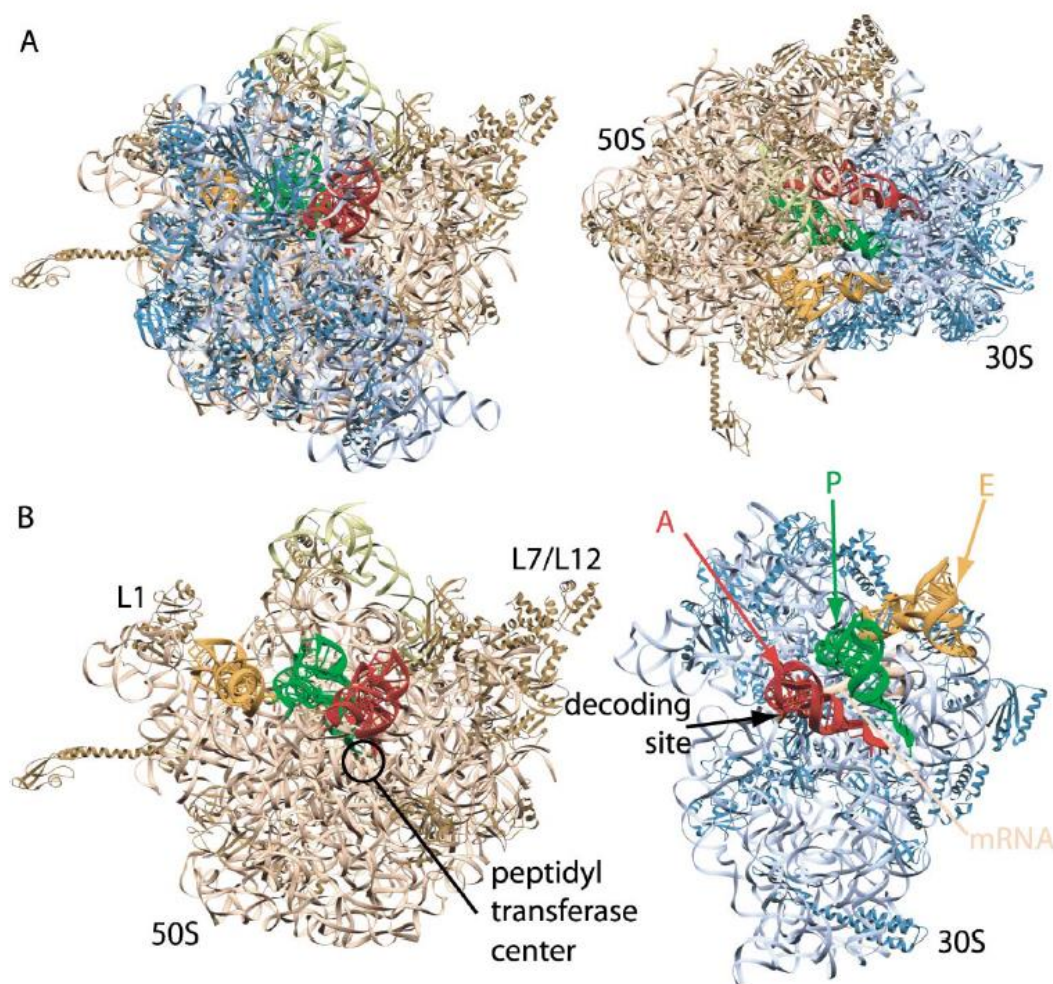


K základným typom RNA patrí:

- mediátorová RNA – **mRNA**,
- ribozómová RNA – **rRNA**,
- transferová RNA – **tRNA**,
- malá jadrová RNA – **snRNA**,
- vírusová RNA.

Mediátorová RNA sprostredkúva prenos genetickej informácie z DNA na proteíny. Jej veľkosť závisí od množstva prenášaných informácií. Syntéza mRNA prebieha ako negatívny (komplementárny) prepis poradia nukleotidov z molekuly DNA na molekulu RNA s tým rozdielom, že v RNA sa nenachádza tymín ale uracil. V eukaryotických bunkách sa na rozdiel od bakteriálnych najprv syntetizuje prekursor mRNA, ktorý prechádza mnohými úpravami. Pôsobením ribonukleáz sa molekula postupne skraca (vystrihujú sa **intróny** a ponechávajú sa **exóny**) a upravujú sa jej obidva konce. Tento proces úpravy sa nazýva **splicing**. Doba života mRNA je u kvasiniek niekoľko desiatok minút a u živočíchov niekoľko hodín.

Ribozómová RNA je stavebnou zložkou ribozómov a predstavuje až 90 % všetkých RNA. Ribozómy baktérií sa skladajú z troch rôznych rRNA, ktoré sa označujú podľa svojich sedimentačných konštánt (5S rRNA, 16S rRNA, 23S rRNA). Ribozómy eukaryotických buniek obsahujú až štyri rôzne rRNA (5S rRNA, 5,8S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA). Ribozómy sú miestom, kde sa prekladá (translatuje) genetická informácia z molekuly mRNA do molekuly proteínu. Z funkčného hľadiska môžeme ribozómy považovať za multienzýmové komplexy, ktoré katalyzujú vznik peptidovej väzby. Ribozómy sa nachádzajú v cytoplazme, mitochondriách, chloroplastoch a v bunkovom jadre.



Obrázok 5.3 Kryštálová štruktúra ribozómu. Štruktúra 70S ribozómu zložená z 30S a 50S podjednotiek.

Transferová RNA. Biologickou funkciou tRNA je prenos aktivovaných aminokyselín pri proteosyntéze. Nachádza sa v cytoplazme. Každá tRNA môže prenášať len jednu aminokyse-

linu, preto bunka musí obsahovať minimálne toľko rozličných tRNA, koľko je prírodných (kódovaných) aminokyselín, ktoré sa zabudovávajú do proteínov. Každá tRNA obsahuje **akceptorové miesto** pre aminokyselinu, ktorú prenáša. Oproti akceptorovému miestu sa nachádza **antikodónová slučka**, ktorá obsahuje **antikodón**. Antikodón je triplet, ktorý pri proteosyntéze nadväzuje na príslušný **kodón** na molekule mRNA.

Najznámejšie funkcie RNA molekúl sú:

- prenos genetickej informácie vo forme **mRNA**;
- väzbu medzi mRNA a vznikajúcimi peptidmi sprostredkujú makromolekuly **tRNA**, ktoré sú "nabité" príslušnou aminokyselinou, čím vzniká aminoacyl-tRNA;
- **rRNA** je zložkou ribozómov, v ktorých prebiehajú translačné pochody;
- **vírusová RNA** prenáša genetickú informáciu RNA vírusov;
- **snRNA** sa zúčastňujú pri zostrihu "nezrelých" prekursorov mRNA (splicing), pri ich editácii, pričom dochádza k tomu, že genetická informácia DNA sa nezhoduje so vznikajúcim proteínom.

Možnosti štúdia nukleových kyselín

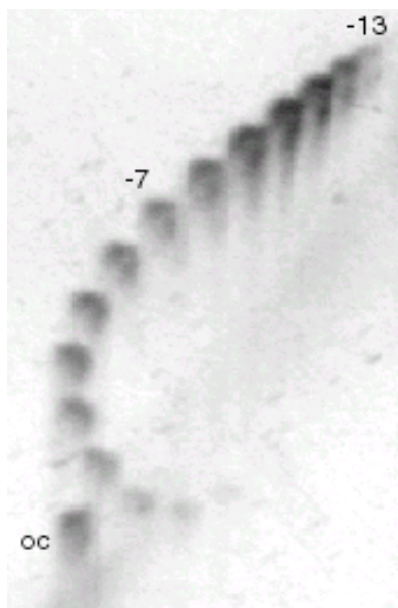
Na štúdium interakcií nukleových kyselín s ligandmi sa využívajú rôzne techniky:

- **optické metódy** (absorpčná spektroskopia, fluorescenčná spektroskopia, Ramanova spektroskopia, kruhový dichroizmus)
- **mikroskopické metódy** (fluorescenčná mikroskopia, elektrónová mikroskopia, atómová silová mikroskopia)
- **hydrodynamické metódy** (izopyknická centrifugácia, sedimentácia)
- **kalorimetrické metódy** (izotermálna kalorimetria, diferenciálna skenujúca kalorimetria)
- **elektroforetické metódy** (jednoduchá elektroforéza, dvojrozmerná elektroforéza, teplotná gradientová gélová elektroforéza)

Elektroforetické metódy sa používajú na separáciu látok, buniek a iných častíc, ktoré majú elektrický náboj. Elektroforéza sa často používa na štúdium bielkovín a nukleových kyselín. Elektroforetické delenie prebieha podľa pohyblivosti makromolekúl v elektrickom poli, ktoré závisí od: veľkosti náboja, sily elektrického poľa, veľkosti a tvaru makromolekúl a podmienok prostredia.

Veľkosť náboja molekuly ovplyvňuje stupeň ionizácie, pH a iónová sila. Elektroforetická pohyblivosť je funkciou náboja, ktorý nesie molekula, molekulovej hmotnosti a je závislá od tvaru, čiže konformácie. Touto metódou sa dajú úspešne sledovať interakcie typu nukleová kyselina-proteín, nukleová kyselina-nukleová kyselina a proteín-proteín. Elektroforéza prebieha v prostredí voľného elektrolytu, alebo v pórovitých nosičoch, ktoré sú nasýtené elektrolytom. Ako nosiče sa používajú škrob, dextran, agaróza a polyakrylamidové gély. V súčasnosti sa pri elektroforetickej separácii najviac používajú agarózové a polyakrylamidové gély. Elektroforéza v polyakrylamidovom géli (PAGE) sa využíva hlavne pri štúdiu proteínov a v malej miere aj nukleových kyselín s menšou molekulovou hmotnosťou. Polyakrylamidový gél bol pri elektroforéze prvýkrát použitý v roku 1959 *Raimondom* a *Weintraubom*. Popularita tohto nosiča je vďaka jeho priehľadnosti, mechanickej stabilite, chemickej inertnosti, stabilite v širokom rozsahu hodnôt pH a jeho nerozpustnosti vo väčšine rozpúšťadiel používajúcich sa pri elektroforéze. Gél môže byť spoľahlivo a reprodukovateľne pripravený z analyticky čistých východných materiálov, ktorých vzájomný pomer má rozhodujúci vplyv na hustotu a priemernú veľkosť pórov gélu. Koncentrácia akrylamidu býva v rozsahu od 3 do 30 %, čo umožňuje separovať látky od 10^2 do 10^6 g/mol, čo odpovedá peptidom s veľkosťou rádovo od jednej aminokyseliny do 10^2 prípadne až 10^3 aminokyselinových zvyškov.

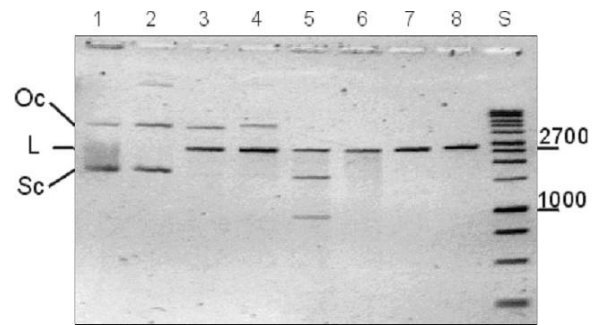
Na štúdium nukleových kyselín sa využíva **agarózová elektroforéza**. Plazmidová DNA sa v bunkách nachádza v početných topologických formách. Vo fyziologických podmienkach sa v dôsledku disociácie fosfátových skupín správa ako polyanión a pri elektroforéze putuje ku kladnej elektróde. V danom prostredí má zmes topoizomérov rovnaký náboj, a preto jediným faktorom, ktorý ovplyvňuje pohyblivosť topoizomérov je priestorová konformácia. Klasická gélová elektroforéza cirkulárnych molekúl je obmedzená deliacou schopnosťou gélu. Jednotlivé topoizoméry s molekulovou hmotnosťou menšou ako 7 kbp (kilobazopár) sa pozorujú pri 1 % agarózovom géli ako jednotlivé pásy.



Obrázok 5.5 Dvojrozmerná elektroforéza plazmidovej DNA (pUC 19).

méry v diagonálnom usporiadaní.

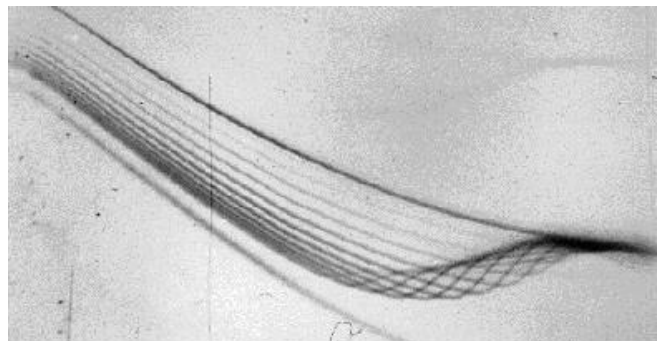
Teplotná gradientová gélová elektroforéza (TGGE) je vhodnou metódou na študovanie konformačných prechodov a stability plazmidovej DNA a na študovanie stability proteínov. TGGE sa prvýkrát použila pri analýze konformačných prechodov a pri sekvenčných variáciách nukleových kyselín v roku 1989. Pri tejto metóde sa využíva lineárny teplotný gradient, ktorý sa vytvára kolmo na smer pohybu makromolekúl. Teplotný gradient je vytvorený prostredníctvom medenej platne spojenjej s elektroforetickou aparátúrou zostave-



Obrázok 5.4 Jednoduchá agarózová elektroforéza (*Oc* – open circular, *L* – linear, *Sc* – supercoiled DNA).

Vyššie topoizoméry nad limitnou hodnotou W_r dávajú pri elektroforéze široký kontinuálny pás superhelikálnej DNA. Tento pás sa skladá z viacerých topoizomérov s rozličnou hodnotou W_r , ale nedokážu sa navzájom jednoznačne oddeliť.

Dvojrozmerná elektroforéza (2D elektroforéza) eliminuje určité nedostatky jednoduchej elektroforézy ako je napr.: nedostatočná deliaca schopnosť, vzájomný prekryv topoizomérov vplyvom štruktúrnych prechodov, komigráciu topologických neekvivalentov a maskovanie lineárnej DNA. Táto metóda umožňuje vypočítať niektoré topologické a termodynamické parametre, napr. zmenu W_r a odpovedajúci počet párov báz, ktoré prešli na alternatívnu štruktúru. Pri 2D elektroforéze sa v prvom smere molekuly rozdelia na základe kompaktného zbalenia a v druhom smere, (ktorý je kolmý na prvý), dochádza k separácii na základe konformačných zmien spôsobených prítomnosťou **interkalátora**. Význam interkalátorov pri 2D elektroforéze spočíva v relaxácii torzného pnutia indukovaného vplyvom superhelikálneho vinutia. Pri kontrolnej dvojrozmernej elektroforéze, keď sa v druhom smere nemenia podmienky prvého smeru, získame topoizo-



Obrázok 5.6 Teplotná gradientová gélová elektroforéza plazmidovej DNA (pUC 19).

nou podľa návrhu *Riesnera*. Pri použití TGGE sa získa priama závislosť na teplote, a tým aj možnosť priamej konfrontácie experimentov s termodynamickými teóriami. Z pokusov TGGE je možné za pomoci štandardných postupov určiť termodynamické parametre (T_m , ΔG , ΔH , ΔS), ktoré podávajú informáciu o stabilite biopolyméru.

Príprava plazmidovej DNA

Kultivácia na tuhých agarových médiách: tuhé pôdy vhodné na kultiváciu v Petriho miskách obsahujú základné komponenty potrebné pre rast buniek (peptón, kvasinkový extrakt, NaCl) aj agar (max 1,5 % roztok). Jednotlivé komponenty sú rozpustené vo vode (pH 7,5) a vysterilizované. Po sterilizácii a ochladení na 55 °C sa pridávajú termolabilné komponenty (napr. antibiotiká) a vylievajú sa do sterilných Petriho misiek. Petriho misky s agarovými pôdami sa po naočkovaní príslušného bakteriálneho kmeňa, pomocou sterilnej bakteriálnej kľučky, kultivujú v obrátenej polohe (hore dnom) pri 37 °C v termostate. Bakteriálne kolónie sa môžu na agarových platniach uchovávať aj niekoľko týždňov v chladničke (pre dlhšie skladovanie bakteriálnych kmeňov sa využívajú glycerínové konzervy, ktoré sa môžu uchovávať aj niekoľko rokov).

Kultivácia v tekutých médiách: tekuté média sa pripravujú z Bacto-peptónu, Bacto-kvasinkového extraktu, NaCl a vody. Tieto zložky sa zmiešajú, upraví sa pH a sterilizujú sa (15 – 20 min) v autokláve alebo inej tlakovej nádobe. Po vysterilizovaní a ochladení sa pridá požadované antibiotikum a kolónia kmeňa, ktorý chceme kultivovať. Bakteriálne bunky kultivujeme v termostate pri teplote 37 °C. Na inokuláciu sa používa nočná bakteriálna kultúra alebo jedna kolónia z agarovej platne. Pretože všetky bunky, vrátane metabolických produktov, zostávajú počas celej doby kultivácie v uzavretom prostredí, je rast podmienený zmenami prostredia. Medzi ne patria hlavne vyčerpanie živín a nahromadenie odpadových produktov. Rýchlosť rastu bakteriálnej kultúry je najvhodnejšie zaznamenávať meraním optickej hustoty (OD) pri vlnovej dĺžke 600 nm.

Izolácia molekuly DNA: základným problémom pri izolácii nukleových kyselín je odstránenie proteínov a polysacharidov takým spôsobom, aby sa neporušila primárna a sekundárna štruktúra molekúl. Pri izolácii je dôležité najprv uvoľniť bunkový obsah rozrušením bunkovej steny a cytoplazmatickej membrány. Narušenie buniek môžeme uskutočniť mechanicky pomocou homogenizátorov, pomocou enzýmu lyzozýmu, ktorý rozkladá polysacharidy bunkovej steny a pomocou detergentov (dodecylsulfát sodný). Molekuly DNA zostávajú v roztoku, po centrifugácii sa vyvrážajú izopropanolom. Zrazenina sa rozpustí a zvyšky proteínov sa odstraňujú roztokom fenol-chloroformu, ktoré sa vyvrážajú na rozhraní organickej a vodnej vrstvy. Inou možnosťou odstránenia proteínov z nukleových kyselín sú detergenty, guanidínchlorid, vysoká koncentrácia solí alebo ich enzýmové odbúravanie proteázami. Z roztoku DNA sa ešte odstráni RNA pomocou RNázy, ktorá štiepi molekulu RNA (ak by sme chceli vyizolovať RNA, tak sa namiesto RNázy použije DNáza). Ďalšou možnosťou rozdelenia DNA a RNA je ultracentrifugácia v rovnovážnom hustotnom gradiente CsCl.

Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie nukleových kyselín: molekuly nukleových kyselín obsahujú purínové a pyrimidínové bázy, ktoré majú aromatický charakter a absorbujú ultrafialové žiarenie s vlnovou dĺžkou 200 – 300 nm. Pri spektrofotometrickom stanovení koncentrácie nukleových kyselín meriame absorbanciu pri 260 nm. Absorbancia s hodnotou 1 pri 260 nm odpovedá koncentrácii: 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri dvojvláknovej DNA,
40 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri jednovláknovej DNA,
40 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri molekule RNA,
20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pri oligonukleotidoch.

Stanovenie čistoty nukleových kyselín: molekuly nukleových kyselín sú najčastejšie znečistené proteínmi, ktoré majú absorpčné maximum pri 280 nm. Pomer absorbancií pri

260 nm a pri 280 nm udáva čistotu nukleových kyselín. Ak je pomer 1,8 – 2,0 môžeme hovoriť o dostatočne čistej DNA alebo RNA.

Použitá literatúra

- Bates, A. D., Maxwell, A.: DNA topology, 2nd edition, Oxford University Press, 2005.
- Ferenčík, M., Škárka, B.: Biochémia, Slovak Academic Press, Bratislava 2000.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- Voet, D., Voet, J. G.: Biochemistry, 3rd edition, John Wiley & Sons, 2004.

TÉMA	NUKLEOVÉ KYSELINY
Úloha 31:	Izolácia DNA zo sleziny
Reagencie:	1. 1 M chlorid sodný 2. 0,4 % hydroxid sodný 3. morský piesok
Materiál:	slezina, centrifúga, centrifugačné skúmavky, drevená špajľa, trecia miska
Postup:	1 g sleziny rozotrieme v trecej miske s morským pieskom. Potom pridáme 25 ml chloridu sodného a miešame 15 minút. Viskozita roztoku stúpa postupom extrakcie DNA. Suspenziu centrifugujeme 10 minút pri 3000 ot/min (1000 g). Viskózný supernatant pomaly vlejeme do 50 ml destilovanej vody. Vytvorí sa sieťka vláknitej vyzrážanej DNA, ktorú navinieme na drevenú špajľu. Ďalej pokračujeme dôkazovou skúškou na DNA (úloha 33)
Úloha 32:	Izolácia RNA z droždia
Princíp:	<i>Po rozrušení bunkovej steny kvasiniek sa RNA extrahuje 0,5 % roztokom NaOH a po úprave pH sa zráža ľadovým etanolom.</i>
Reagencie:	1. dietyléter 2. 0,4 % roztok hydroxidu sodného 3. 5 % roztok kyseliny octovej 4. 50 % roztok kyseliny octovej 5. vychladený etanol 6. morský piesok
Materiál:	pekárenské droždie, trecia miska, centrifúga, centrifugačné skúmavky
Postup:	Zmes 10 g pekárenského droždia, 1 ml destilovanej vody a 1 ml dietyléru rozotrieme s malým množstvom morského piesku v trecej miske. Do homogenátu pridáme 25 ml 0,4 % NaOH a pokračujeme v rozotieraní ešte asi 15 minút. Pomocou 5 % kyseliny octovej (~ 3 ml) upravíme pH na 6. Zmes centrifugujeme 10 minút pri 3000 ot/min (1000 g). Supernatant zlejeme do kadičky a upravíme jeho pH na 3,5 pomocou 50 % roztoku kyseliny octovej. Odmeriame objem supernatantu a pridáme k nemu rovnaký objem vychladeného etanolu. Vytvorená zrazenina predstavuje ribonukleoproteín. Počkáme 5 min a centrifugujeme 10 min pri 3000 ot/min (1000 g). Supernatant zlejeme a zrazeninu použijeme v úlohe 34 .
Úloha 33:	Dôkaz zložiek DNA
Princíp:	<i>2-deoxy-pentózy, podobne ako väčšina ostatných monosacharidov, poskytujú zahrievaním v kyslom prostredí deriváty furalu a niektoré ďalšie chromogénne látky, ktoré dávajú s aromatickými amínmi (ale tiež s tiolovými zlúčeninami) charakteristické sfarbenie.</i>
Reagencie:	1. 0,4 % roztok hydroxidu sodného 2. difenylamín (1 g v 100 ml ľadovej kyseliny octovej a 2,75 ml koncentrovanej kyseliny sírovej) 3. vzorka DNA (z úlohy 31)
Materiál:	skúmavky, stojan na skúmavky, vodný kúpeľ, mikropipety
Postup:	Do skúmavky vložíme malé množstvo (10 až 100 µg) vyzrážaného deoxyribonukleoproteínu (získaného v úlohe 31) a rozpustíme v 1 ml 0,4 % NaOH. K roztoku pridáme 1 ml difenylamínu a reakčnú zmes necháme 10 minút vo vriacom vodnom kúpeli. Vzniká modré sfarbenie, charakteristické pre 2-deoxy-

	pentózy (2-deoxyribózy).
Pozorovanie:	Zaznamenáme farebnú zmenu.
Úloha 34:	Dôkaz zložiek RNA
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. 0,4 % roztok hydroxidu sodného 2. difenylamín 3. vzorka RNA (z úlohy 32)
Materiál:	skúmavky, stojan na skúmavky, vodný kúpeľ, mikropipety
Postup:	Do centrifugačnej skúmavky k zrazenine RNA z úlohy 32 pridáme 1 ml 0,4 % NaOH. Po rozpustení zrazeniny prelejeme roztok do sklenenej skúmavky a pridáme 1 ml difenylamínu. Roztok necháme 10 minút vo vriacom kúpeli. Vzniká zelené sfarbenie.
Pozorovanie:	Zaznamenáme farebnú zmenu.

TÉMA	NUKLEOVÉ KYSELINY
Úloha 35:	Mikropreparatívna izolácia plazmidovej DNA
Princíp:	<i>Na overenie prítomnosti plazmidovej DNA v danom bakteriálnom kmeni a na zistenie efektivity ďalšej izolácie plazmidovej DNA z väčších množstiev je využívaná mikropreparatívna izolácia plazmidovej DNA.</i>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. TEG: 50 mM glukóza, 10 mM kyselina etyléndiamintetraoctová (EDTA), 25 mM tlmivý roztok Tris 2. TE: 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8,3) 3. 3 M KAc: 120 ml 5 M roztoku CH₃COOK (pH 7), 23 ml ľadovej CH₃COOH 4. fenol-chloroform (fenol:chloroform:izoamylalkohol = 25:24:1) 5. 0,2 M NaOH + 1 % dodecylsulfát sodný (SDS) 6. izopropylalkohol 7. 96 % etanol 8. nočná bakteriálna kultúra
Materiál:	skúmavky Eppendorf s objemom 1,5 ml, centrifúga, mikropipety
Postup:	<p>Dvakrát po 1,5 ml nočnej bakteriálnej kultúry centrifugujeme po 5 min v plastovej mikroskúmavke Eppendorf pri 5000 ot/min (2400 g). Supernatant zlejeme a sediment rozsuspendujeme v 100 µl roztoku TEG. Pridáme 200 µl roztoku 0,2 M NaOH + 1 % SDS. Zmes prevaľujeme v 'eppendorfke' 5 minút. Po 5 minútach pridáme 150 µl roztoku KAc a poriadne premiešame.</p> <p>Zrazeninu centrifugujeme 10 minút pri 10000 ot/min (9500 g). Supernatant odoberieme do čistej 'eppendorfkovej' skúmavky, pridáme 0,6 objemu (cca 300 µl) izopropanolu, premiešame a necháme zrážať 20 minút v chladničke. Po 20 minútach zrazeninu centrifugujeme 10 minút pri 10000 ot/min (9500 g), supernatant zlejeme a zrazeninu vysušíme vo vákuovej rotačnej sušičke (~ 30 min). Po vysušení zrazeninu rozpustíme v 100 µl roztoku TE a pridáme 100 µl roztoku fenolchloroformu. Premiešame a centrifugujeme 5 minút pri 5000 ot/min (2400 g).</p> <p>Do čistej 'eppendorfkovej' skúmavky opatrne odoberieme vrchnú vodnú vrstvu obsahujúcu DNA, znova pridáme 100 µl roztoku fenol-chloroformu a tento postup opakujeme do vymiznutia medzivrstvy. Potom pridáme dvojnásobný objem 96 % etanolu a necháme zrážať pri -20 °C. Nakoniec zrazeninu centrifugujeme 5 minút pri 10000 ot/min (9500 g), vysušíme, rozpustíme v 20 µl roztoku TE a použijeme v úlohách 36, 37 a 38.</p>

TÉMA	NUKLEOVÉ KYSELINY
Úloha 36:	Elektroforéza nukleových kyselín
Reagencie:	1. $0,5 \times$ TBE (45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 2 mM kyselina etyléndiamíntetraoctová) 2. agaróza 3. <i>loading dye</i> (0,1 % roztok <i>xylene cyanol</i> a 0,1 % roztok <i>bromphenol blue</i> v 50 % glycerole) 4. etídium bromid (1 mg/ml) 5. vyizolovaná DNA z úlohy 35 (10 μ l vzorky DNA + 3 μ l <i>loading dye</i>)
Materiál:	elektroforetická aparátúra, mikropipety, kadička s objemom 100 ml, mikrovlnka
Postup:	Zriedením si zo zásobného roztoku $5 \times$ TBE pripravíme tlmivý roztok $0,5 \times$ TBE. Na prípravu 1 % gélu potrebujeme 80 ml $0,5 \times$ TBE, 0,8 g agarózy a 80 μ l etídium bromidu. Všetko spolu zmiešame a prevaríme. Po ochladení na približne 60 °C nalejeme gél do pripravenej aparátúry. Zasunieme hrebeň. Po stuhnutí gélu z neho opatrne vytiahneme hrebeň (slúži na tvorbu komôrok) a gél v aparátúre prelejeme roztokom $0,5 \times$ TBE. Do komôrok potom nanášame vzorky DNA (10 μ l) zmiešané s tzv. <i>loading dye</i> (3 μ l). Nastavíme napätie (~ 150 V) a spustíme elektroforézu. Vzorka DNA sa pohybuje od katódy (záporná elektróda) k anóde (kladná elektróda). Približne po 60 min elektroforézu vypneme.
Pozorovanie:	Pod UV lampou pozorujeme pásy plazmidovej DNA. Ich vzdialenosť od štartu závisí od ich veľkosti a stupňa zbalenia.
Úloha 37:	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty nukleových kyselín
Princíp:	<p>Molekuly nukleových kyselín obsahujú purínové a pyrimidínové zásady, ktoré majú aromatický charakter a absorbujú ultrafialové žiarenie s vlnovou dĺžkou 200 – 300 nm. Pri spektrofotometrickom stanovení koncentrácie nukleových kyselín meriame absorbanciu pri 260 nm. Absorbancia s hodnotou 1 pri 260 nm odpovedá koncentrácii: 50 μg/ml pri dvojvláknovej DNA, 40 μg/ml pri jednovláknovej DNA, 40 μg/ml pri molekule RNA, 20 μg/ml pri oligonukleotidoch.</p> <p>Molekuly nukleových kyselín sú najčastejšie znečistené proteínmi, ktoré majú absorpčné maximum 280 nm. Pomer absorbancií pri 260 nm a 280 nm udáva čistotu nukleových kyselín. Ak je pomer A_{260nm}/A_{280nm} v rozmedzí 1,8 až 2,0, môžeme hovoriť o dostatočne čistej DNA alebo RNA.</p>
Reagencie:	1. vyizolovaná DNA z úlohy 35 2. 45 mM tlmivý roztok Tris
Materiál:	UV-VIS absorpčný spektrofotometer, mikropipety, kremenné kyvety
Postup:	Na UV-VIS spektrofotometri nastavíme rozmedzie vlnových dĺžok od 350 do 220 nm. Do kremennej kyvety napipetujeme 3 ml tlmivého roztoku Tris a odmeriame absorbanciu (tzv. <i>baseline</i>). Potom do tej istej kyvety pridáme také množstvo DNA, aby výsledná absorbancia pri 260 nm bola v rozmedzí 0,5 až 1,2. Nakoniec zaznamenáme hodnotu absorbancie pri 260 a 280 nm.
Vyhodnotenie:	Z hodnôt absorbancií pri 260 nm a 280 nm vypočítame koncentráciu a čistotu DNA.
Záver:	Uvedieme koncentráciu a čistotu našej vzorky DNA.

Úloha 38:	Teplotná stabilita nukleových kyselín
Princíp:	<p>Často používaný spôsob na denaturáciu DNA je využitie vysokej teploty, ktorej účinkom dochádza k vzájomnému oddeľovaniu vlákien DNA. Keďže sa makromolekula DNA vyznačuje výraznou absorpciou pri 260 nm, je možné tento proces monitorovať spektrofotometricky. Pri prechode dvojláčkovej DNA na jednovláčkové zložky dochádza k zvyšovaniu absorpcie približne o 30%. Tomuto javu hovoríme hyperchrómny efekt.</p> <p>Jedným z parametrov, ktorý poukazuje na stabilitu DNA je teplota prechodu, T_m (teplota, pri ktorej je polovica pôvodnej dvojláčkovej DNA vo forme príslušných jednovláčkových reťazcov). Hodnota T_m značne závisí od množstva G–C párov. Je známe, že medzi guanínom a cytozínom sú 3 vodíkové väzby, na rozdiel od adenínu a tymínu, medzi ktorými sú len 2 vodíkové väzby. V praxi to znamená, že so zvyšujúcim sa podielom G–C párov narastá aj teplota prechodu makromolekuly DNA.</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. vyizolovaná DNA z úlohy 35 2. 45 mM tlmivý roztok Tris
Materiál:	UV-VIS absorpčný spektrofotometer, mikropipety, kremenné kyvety
Postup:	<p>Ak je k dispozícii spektrofotometer s elektronicky riadeným ohrevom (softvérovo ovládaným Peltierovým článkom), napipetujeme potrebné množstvo vyizolovanej nukleovej kyseliny do kremennej kyvety s tlmivým roztokom a nastavíme ohrev na 2 °C/min. Začiatočnú teplotu nastavíme na 30 °C a koncovú na 90 °C. Spustíme meranie. Zaznamenávame spektrá v rozmedzí vlnových dĺžok 220 až 350 nm.</p>
Vyhodnotenie:	<p>Zostrojíme graf závislosti absorpcie pri 260 nm od teploty. Bodmi preložíme krivku (tzv. S-krivka) a odčítame teplotu prechodu ($T_m = \text{melting temperature}$) našej vzorky plazmidovej DNA.</p>
Záver:	Uvedieme hodnotu T_m našej vzorky DNA.

6 VITAMÍNY

Vitamíny sú organické zlúčeniny exogénneho pôvodu, potrebné na udržiavanie normálnych metabolických pochodov v tele živých organizmov. Pri nedostatku vitamínov nastávajú zmeny v normálnom raste, vývoji organizmu a môže dôjsť k rozvoju chorôb ako skorbut, krivica, beriberi.

Tieto choroby sú známe po mnohé storočia, ale myšlienka, že môžu byť spôsobené nedostatkom istej zložky potravy je relatívne nová. Fakt, že konzumácia malého množstva citrusových plodov môže zabrániť skorbutu, bol zistený až v roku 1757. Prešlo ešte viac ako 120 rokov, kým sa prišlo na to, že malá dávka jačmeňa pridaná k hladkej ryži môže zabrániť chorobe beriberi.

Až v roku 1911 poľský biochemik *Casimir Funk* vyslovil "teóriu vitamínov" – esenciálnych zložiek potravy, ktoré môžu zabrániť vzniku istých chorôb. Podarilo sa mu izolovať faktor z jedla, ktorý bránil vzniku choroby beriberi a nazval ho "*vitamine*", čím chcel vyjadriť, že ide o aminy dôležité pre život. Mnoho vitamínov známych v súčasnosti nie sú aminy, ale názov vitamín, označujúci tieto zložky potravy už ostal.

V počiatočkoch bola presná štruktúra a tým aj chemický názov vitamínov neznámy. V snahe vyhnúť sa názvom typu "skorbutu zabraňujúci faktor", vedci začali používať písmeňá, ktorými označovali rôzne vitamíny. Tento systém sa stal natoľko populárnym, že napriek tomu, že v súčasnosti je známa presná štruktúra vitamínov, ich názvy ostali pôvodné. V niektorých prípadoch sa zistilo, že vitamín pozostáva z viacerých zložiek ako sa pôvodne myslelo, preto máme vitamíny typu B₁, B₂, atď.

Základné funkcie vitamínov a ich vlastnosti možno v podstate zhrnúť do troch bodov:

1. Vitamíny sú faktory exogénne, ktoré môže získať určitý heterotrofný organizmus len z vonkajších zdrojov (potravou), pretože si ich nevie sám vlastnými prostriedkami vyrobiť. Preto sú to látky pre taký organizmus nevyhnutné (esenciálne).
2. Vitamíny sú faktory, ktoré pôsobia už v malých koncentráciách, neporovnateľných s kvantitatívnou potrebou základných živín (sacharidy, tuky, bielkoviny). Pôsobia ako biokatalyzátory a nezúčastňujú sa tvorby tkaniva (ako stavebné jednotky), ani dodávky energie.
3. Funkciou vitamínov je, že buď samotné, alebo ich metabolity (koenzýmy), urýchľujú premenu látok, a teda aj premeny energie, a preto sú pre normálne životné funkcie daného organizmu nevyhnutné. Na upresnenie je potrebné dodať, že aj keď dnes je presne známa úloha mnohých vitamínov v slede metabolických dejov, objasnenie ich úplnej funkcie v organizme je doteraz neúplné. Mnohé vitamíny sú zapojené do enzýmových systémov – vytvárajú ich koenzýmovú zložku – u niektorých vitamínov však dodnes nie je príslušný enzýmový systém známy.

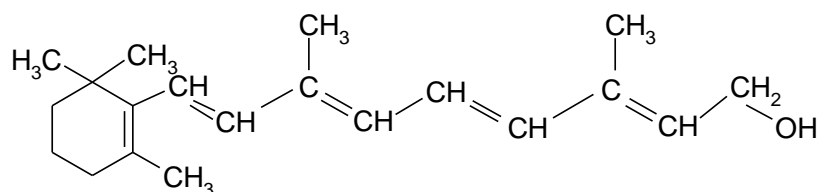
Vo všeobecnosti, vitamíny sa delia na:

■ **lipofilné** (rozpuštné v tukoch). Patria sem axeroftol a jeho izoméry, kalciferoly, tokoferoly a vitamíny K. Vyskytujú sa v orgánoch bohatých na lipidy, u živočíchov v tukovom tkanive, napr. v pečeni, u rastlín v semenách.

■ **hydrofilné** (rozpuštné vo vode). Patria sem členy komplexu vitamínov B spolu s cholínom, inozitolom a kyselinou *p*-aminobenzoovou. Obyčajne sa do tzv. komplexu vitamínov B zahŕňajú všetky vo vode rozpuštné vitamíny nachádzajúce sa v kvasinkách a pečeni. Najznámejšie sú tiamín, riboflavín, kyselina nikotínová.

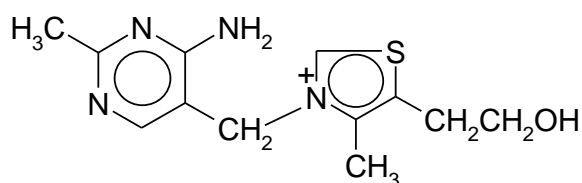
V nasledujúcom zozname uvádzame chemické štruktúry vitamínov, ich efekt, príznaky nedostatku a vhodné zdroje:

Vitamín A – retinol, axeroftol



Vlastnosti	Efekt	Príznaky nedostatku	Vhodné zdroje
<ul style="list-style-type: none"> - dá sa získať z karoténov, - rozpustný v tukoch, nerozpustný vo vode, - tepelne stabilný, - podlieha zmenám pôsobením svetla, - citlivý na oxidáciu 	<ul style="list-style-type: none"> - podporuje rast, - esenciálny pre normálnu vitalitu epitelálnych buniek, - pomáha pri rezistencii voči infekciám, - esenciálny pre správnu funkciu očnej sietnice, - pomáha pri normálnej činnosti žliaz, - esenciálny počas tehotenstva a dojčenia, - predlžuje život. 	<p>Príznaky nedostatku</p> <p>Extrémne</p> <ul style="list-style-type: none"> - kožné problémy, - infekcie, - sterilita, - slabosť, - strata na váhe, - atrofia žliaz, - degenerácia nervov <p>- suchosť rohovky;</p> <p>Mierne</p> <ul style="list-style-type: none"> - spomalený rast, - hnačka, - žalúdočné problémy, - nechutenstvo, - oslabená imunita, - problémy so zubami a ďasnami, - suchá koža, - šeroslepota, - znížená tvorba mlieka 	<ul style="list-style-type: none"> marhule, asparágus, banány, brokolica, maslo, mrkva, syr, treska, pečeňový olej, kukurica, vajcia, zelený hrášok, zmrzlina, hlávkový šalát, pečeň, mlieko, broskyne, paprika, slivky, melón, špenát, sladké zemiaky, paradajky

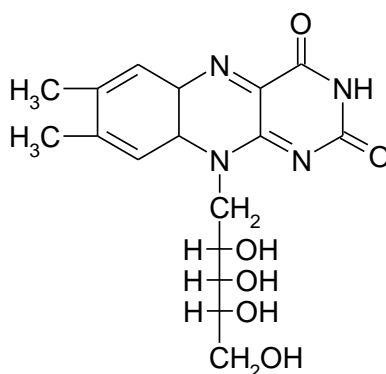
Vitamín B₁ – tiamín



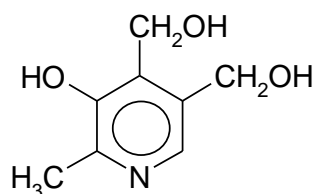
Vlastnosti	Efekt	Príznaky nedostatku	Vhodné zdroje
<ul style="list-style-type: none"> - rozpustný vo vode, nerozpustný v tukoch, - v suchej konzistencii stabil- 	<ul style="list-style-type: none"> - ako prekurzor koenzýmu tiamínpyrofosfát je nevyhnutný pre reakcie katalyzované pyruvátdehydrogenázou a α- 	<p>Príznaky nedostatku</p> <p>Extrémne</p> <ul style="list-style-type: none"> - beriberi, - polyneuritída, - paralýza, - svalová atrofia, 	<ul style="list-style-type: none"> asparágus, slanina, otruby, chlieb, kariofiol, kukurica, vajcia, ryby, obilniny, hlávkový šalát,

ný voči teplu	ketoglutarátdehydrogenázou v citrátovom cykle, - podporuje rast, - stimuluje apetít, - zúčastňuje sa v metabolizme cukrov a tukov, - esenciálny pre normálne podmienky a činnosť nervového tkaniva	- atrofia žliaz, - strata váhy, - nepokoj; Mierne - spomalený rast, - slabosť, - pomalý tlkot srdca, - srdcové poruchy, - nechutenstvo, - žalúdočné problémy, - znížená peristaltika, - znížená tvorba mlieka, - poruchy vo funkcii žliaz, - nervozita	pečeň, mäso, mlieko, orechy, pomaranče, hrášok, ananás, zemiaky, slivky, sója, špenát, paradajky
---------------	--	--	--

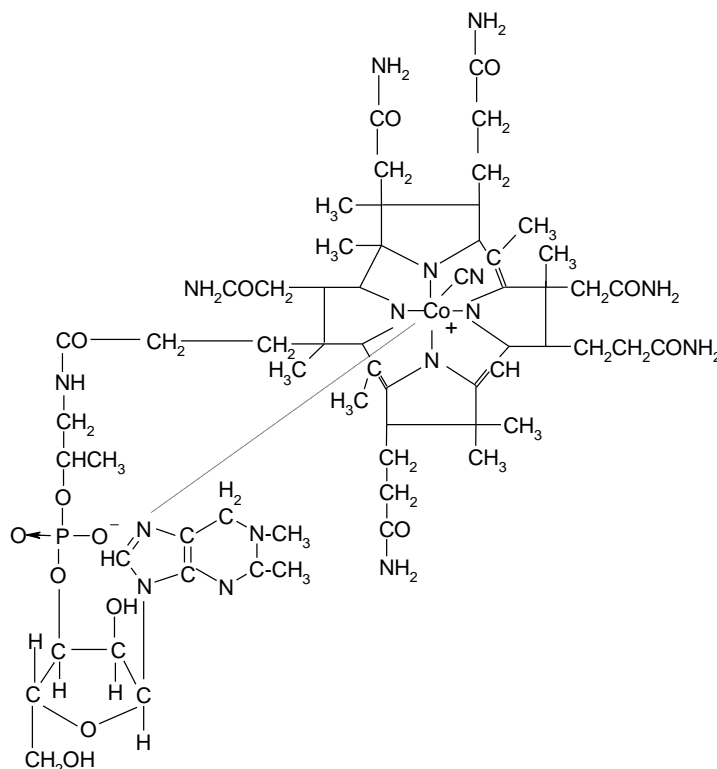
Vitamín B₂ – riboflavín



Vlastnosti	Efekt	Príznaky nedostatku	Vhodné zdroje
- rozpustný vo vode, - odolný voči teplu, - stabilný voči oxidácii, - citlivý na svetlo	- ako prekurzor koenzýmov flavínadenínukleodid (FAD) a flavínmononukleotid (FMN) sa zúčastňuje širokej škály redoxných reakcií, - zlepšuje rast, - predlžuje život, - esenciálny pre nervové tkanivo, - esenciálny pre bunkové dýchanie	Extrémne - slabosť, - strata váhy, - strata funkcie čriev, - porucha centrálného nervového systému, - vypadávanie vlasov, - katarakta, - zápal kože; Mierne - poruchy trávenia, - narušený rast, - strata aktivity, - znížená tvorba mlieka	asparágus, slanina, banány, otruby, brokolica, syr, kukurica, vajcia, ryby, obilniny, grapefruit, hlávkový šalát, mäso, mlieko, orechy, cibuľa, hrášok, paprika, slivky, hrozienka, jahody, špenát, paradajky

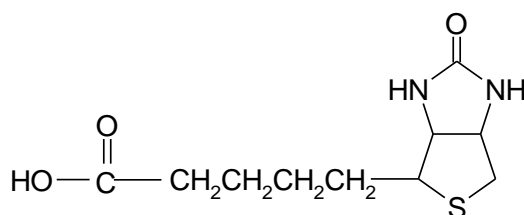
Vitamín B₆ – pyridoxín

Vlastnosti	Efekt	Príznaky nedostatku	Vhodné zdroje
- rozpustný vo vode a v alkohole, - odolný voči teplu, - veľmi citlivý na svetlo	- ako prekurzor pyridoxalfosfátu – prostetickej skupiny aminotransferáz a dekarboxyláz – je esenciálny pre metabolizmus aminokyselín	Extrémne - zápal kože, - poruchy tkaniva, - oftalmia, - abscesy, - hnačka; Mierne - spomalený rast, - narušená koordinácia svalov	kapusta, vaječný žĺtok, ryby, šošovica, mäso, mlieko, pšeničné klíčky, zrna

Vitamín B₁₂ – kyanokobalamín

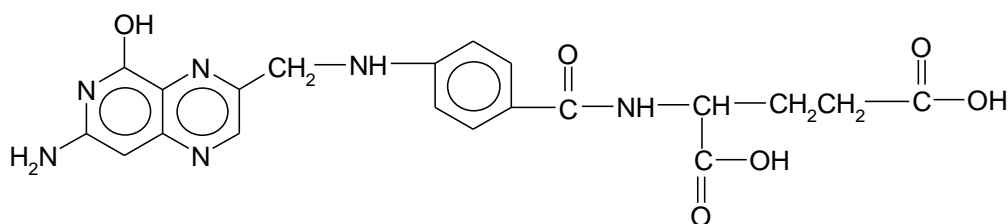
Vlastnosti	Efekt	Príznaky nedostatku	Vhodné zdroje
- rozpustný vo vode	- nevyhnutný pre tvorbu DNA	- perniciózna anémia	vajcia, mäso, mlieko, mliečne produkty

Biotín

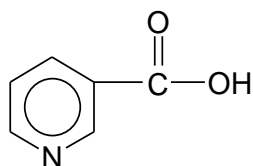


Vlastnosti	Efekt	Príznaky nedostatku	Vhodné zdroje
- rozpustný vo vode, - syntetizovaný črevnými baktériami, preto jeho nedostatok u ľudí je veľmi zriedkavý	- je prostetickou skupinou karboxyláz nevyhnutných pre metabolizmus oxalacetátu, mastných kyselín a aminokyselín, - esenciálny pre cievny systém a pre zdravú pokožku	- zápal kože a nervov	vajcia, vnútornosti, mäso, zelenina

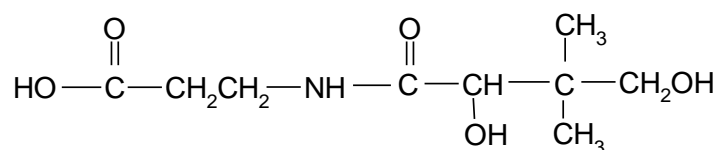
Kyselina listová (folová)



Vlastnosti	Efekt	Príznaky nedostatku	Vhodné zdroje
- rozpustná vo vode, - syntetizovaná črevnými baktériami, preto jeho nedostatok u ľudí je veľmi zriedkavý	- esenciálna pre produkciu dôležitých štrukturálnych zložiek v bunke	- anémia, - narušené vstrebávanie živín cez črevnú stenu	zelená listová zelenina, mäso, kvasinky

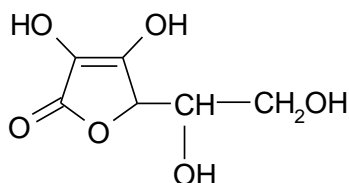
Kyselina nikotínová – niacín, vitamín B₃

Vlastnosti	Efekt	Príznaky nedostatku	Vhodné zdroje
- rozpustná v alkohole a v horúcej vode	- ako súčasť koenzýmov NAD a NADP je nevyhnutný pre fungovanie dehydrogenáz, - podporuje rast, - dôležitá pre normálnu funkciu kože, - dôležitá pre normálnu funkciu črevného traktu	Extrémne - pellagra (drsná koža), - dermatitída, - znižovanie kostnej drene, - hnačka, - zvracanie, - choromyseľnosť, - slinenie; Mierne - jasne červená farba kože, - zapálené ústa, - nervozita, - zlé trávenie, - zápcha, - nechutenstvo, - nevoľnosť, - bolesť hlavy, - strata hmotnosti	otruby, vajcia, ryby, mäso, mlieko, ovsená múka, orechy, hrášok, paprika, zemiaky, špenát, paradajky, pšeničné klíčky, tmavý chlieb

Kyselina pantoténová

Vlastnosti	Efekt	Príznaky nedostatku	Vhodné zdroje
- rozpustná vo vode, - nedostatok u ľudí nepravdepodobný	- ako súčasť koenzýmu A je dôležitá pre metabolizmus tukov, proteínov a sacharidov, - nevyhnutná pre produkciu energie a syntézu niektorých hormónov	- sivé vlasy, - krvácanosť, - zápal kože, - poruchy rastu	vaječný žĺtok, jadrá, mlieko, mliečne produkty, vnútornosti, zelenina, kvasinky

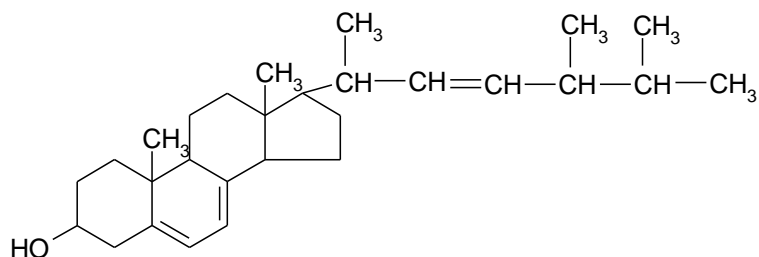
Vitamín C – kyselina askorbová

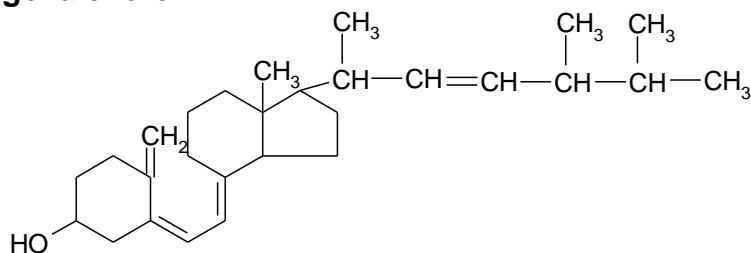
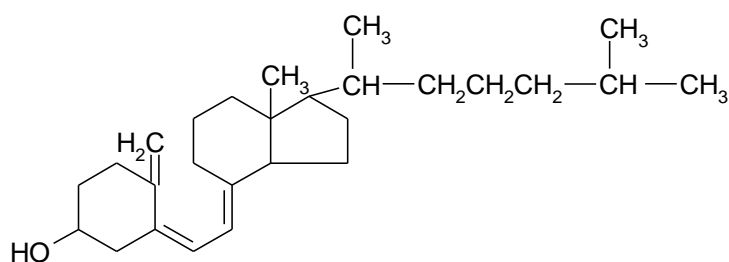


Vlastnosti	Efekt	Príznaky nedostatku	Vhodné zdroje
<ul style="list-style-type: none"> - rozpustná vo vode, nerozpustná v tuku, - ničí sa vysušením a varením na vzduchu, nie v tlakovom hrnci, - veľmi citlivá na oxidáciu 	<ul style="list-style-type: none"> - dôležité redukčné činidlo pri hydroxylácii lyzínu a prolínu v protokolagéne, - bráni skorbutu, - dôležitá pre zdravé zuby, - stimuluje rast, - zlepšuje apetít, - dôležitý pre funkciu žliaz, - zúčastňuje sa obrany proti bakteriálnym toxínom, - esenciálna pre tkanivové dýchanie 	<p>Extrémne</p> <ul style="list-style-type: none"> - skorbut, - anémia, krvácavosť, - opuch kĺbov, - opuch ďasien, - strata zubov, - krehké kosti, - sterilita, - infekcie dýchacieho a črevného systému, - atrofia svalov, - žalúdočné vredy; <p>Mierne</p> <ul style="list-style-type: none"> - spomalený rast, - kazivosť zubov, - narušená stavba kostí, - mäkké kĺby, - nedostatočná odolnosť voči infekciám, - žalúdočné problémy, - lámavé krvné kapiláry (vlásočnice), - únava, - znížená tvorba mlieka 	<ul style="list-style-type: none"> asparágus, banány, brokolica, fazuľa, karfiol, citrusové plody, mušle, kukurica, hlávkový šalát, broskyne, hrášok, ananás, zemiaky, maliny, špenát, dyna, jahody, paradajky

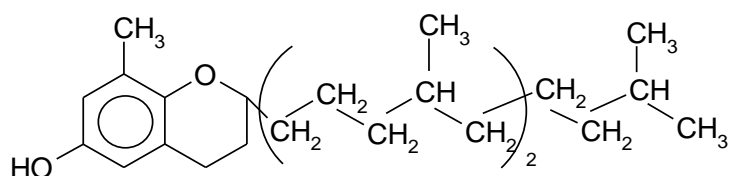
Vitamíny skupiny D:

Provitamín D – ergosterol

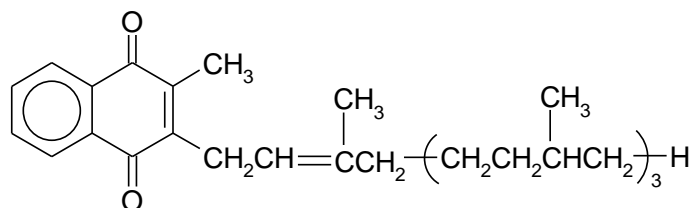


Vitamín D₂ – ergokalciferol**Vitamín D₃ – cholekalciferol**

Vlastnosti	Efekt	Príznaky nedostatku	Vhodné zdroje
<ul style="list-style-type: none"> - v tuku rozpustný, nerozpustný vo vode, - stabilný voči oxidácii a teplu 	<ul style="list-style-type: none"> - reguluje metabolismus vápnika a fosforu, - esenciálny pre normálny rast kostí a vývoj zubov 	<p>Extrémne</p> <ul style="list-style-type: none"> - rachitída (krivica u detí), - zväčšené kĺby, - krivá chrbtica, - mäkké kosti, - pórovité kosti, - významná strata vápnika a fosforu, - spomalený rast; <p>Mierne</p> <ul style="list-style-type: none"> - slabá asimilácia vápnika a fosforu, - nízka hladina vápnika, fosforu a fosfatázy v krvi, - slabé ukladanie vápnika a fosforu do zubov a kostí, - znížená aktivita, - kazivosť zubov, - oneskorené uzavretie fontanely, - únava, - spomalený rast 	<ul style="list-style-type: none"> hovädzina, maslo, syr, čokoláda, kokos, kukuričný olej, vaječný žĺtok, ryby, zmrzlina, mlieko

Vitamín E – α -tokoferol

Vlastnosti	Efekt	Príznaky nedostatku	Vhodné zdroje
- rozpustný v tukoch, nerozpustný vo vode, - odolný voči teplu	- nedostatok pozorovaný iba u laboratórných zvierat kŕmených špeciálnou stravou	Extrémne - sterilita, - spomalenie rastu, - svalová dystrofia, - degeneratívne choroby nervového systému; Mierne - nízka plodnosť, - znížená tvorba mlieka, - svalová slabosť	vajcia, mäso, mlieko, takmer všetky zelené listy a celé zrná, rastlinný olej

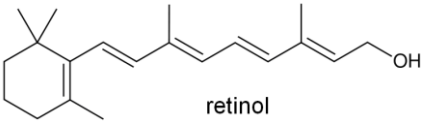
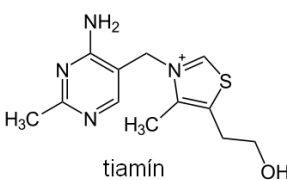
Vitamín K – fylochinón

Vlastnosti	Efekt	Príznaky nedostatku	Vhodné zdroje
- rozpustný v tukoch, nerozpustný vo vode, - odolný voči teplu, - podlieha zmenám vplyvom silných kyselín a oxidantov	- dôležitý pre karboxyláciu kyseliny glutámovej na kyselinu γ -karboxyglutámovú v preprotrombíne, - esenciálny pri zrážaní krvi, bráni krvácanosti	Extrémne - krvácanosť, - anémia; Mierne - spomalená zrážanlivosť krvi	karfiol, žltky z vajec, ryža, špenát, sójový olej, paradajky

Použitá literatúra

- Devlin T. M.: Textbook of biochemistry with clinical correlations, 6th edition, John Wiley & Sons, New York 2005.
- Eaton D. C.: Laboratory investigations in organic chemistry, McGraw-Hill, Inc., New York 1989.

TÉMA	VITAMÍNY						
Úloha 39:	Stanovenie koncentrácie vitamínu C 2,4-dinitrofenylhydrazínom						
Princíp:	<p>Kyselina L-askorbová (vitamín C) sa oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovú aj pretrepaním na vzduchu za katalýzy aktívnym uhlím.</p> <div style="text-align: center;"> </div> <p>Kyselina dehydroaskorbová s dinitrofenylhydrazínom dáva v slabo redukujúcom prostredí tiomočoviny osazón, ktorý sa rozpúšťa v koncentrovanej kyseline sírovej. Červené sfarbenie roztoku sa hodnotí spektrofotometricky.</p>						
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> štandardný roztok kyseliny askorbovej s koncentráciou 15 g/100 ml roztok vzorky z jablka, citrónu, pomaranča, mandarínky (K šťave z ovocia pridáme trocha aktívneho uhlia, premiešame a necháme reagovať 10 minút. Prefiltrujeme a filtrát zriedime v pomere 1:10) 2,5 % roztok tiomočoviny v 50 % etanole 2 % roztok 2,4-dinitrofenylhydrazínu (DNFH) v 50 % etanole doplníme 0,5 ml kyseliny chlorovodíkovej na celkový objem 100 ml 85 % roztok kyseliny sírovej 						
Materiál:	sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nadstavcom, absorpčný spektrofotometer, plastové kvety, laboratórna trepačka, termostat						
Postup:	Do šiestich označených skúmaviek pipetujeme sklenenými pipetami štandardný roztok vitamínu C podľa tabuľky 6.1 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených. Do siedmej skúmavky pipetujeme namiesto štandardu 1 ml vzorky ovocnej šťavy (do zošita nezabudneme zapísať o aké ovocie išlo).						
TABUĽKA 6.1	0	1	2	3	4	5	vzorka
štandard vitamínu C [ml]	–	0,2	0,4	0,6	0,8	1	–
vzorka ovocnej šťavy [ml]	–	–	–	–	–	–	1
destilovaná H ₂ O [ml]	1	0,8	0,6	0,4	0,2	–	–
tiomočovina	1 kv.	1 kv.	1 kv.	1 kv.	1 kv.	1 kv.	1 kv.
	premiešať inkubovať 60 min pri 37 °C						
85 % H ₂ SO ₄ [ml]	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
dinitrofenylhydrazín [ml]	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	inkubovať 30 min pri laboratórnej teplote určiť absorbanciu pri 540 nm						
množstvo vitamínu v skúmavke [mg]	0	30	60	90	120	150	x
absorbancia pri 540 nm	–						
Vyhodnotenie:	Pomocou kalibračných roztokov (skúmavky 1 až 5) zostrojíme kalibračný graf (závislosť absorbancie štandardného roztoku vitamínu C pri 540 nm od množstva) a z neho určíme množstvo vitamínu C v mg na 1 ml vzorky (x) . Túto hodnotu vynásobíme príslušným riedením.						
Záver:	Uvedieme koncentráciu vitamínu C v ovocnej šťave (v mg/ml).						

Úloha 40:	Dôkaz vitamínu A
	Reakcia s kyselinou sírovou
Princíp:	<p>Provitamín A je dôležitou súčasťou stravy, pretože v ľudskom organizme sa z neho vytvára vitamín A (retinol). Tento vitamín je dôležitý pri redoxných procesoch v organizme, biochemických dejoch videnia a podobne. Preto by ho mal byť v potrave dostatok. Nachádza sa napr. v mrkve a paradajkách. Jeho nedostatok spôsobuje poruchy zraku a rastu. Priemerná denná spotreba vitamínu A v ľudskom organizme je približne 2,8 mg.</p> <p>Provitamín A (chemicky beta karotén) patrí do skupiny karoténov, ktoré sa v prítomnosti kyseliny sírovej sfarbia na modro alebo modrofialovo.</p>
	 <p style="text-align: center;">retinol</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. koncentrovaná kyselina sírová 2. petroléter 3. nastrúhaná mrkva
Materiál:	skúmavky, stojan na skúmavky, mikropipety
Postup:	Do skúmavky dáme postrúhanú mrkvu a pridáme 3 – 5 ml petroléteri. Skúmavku zazátkujeme a dôkladne pretrepeme. Obsah skúmavky necháme ustáť 2 – 4 min a výluh zlejeme do druhej skúmavky. K výluhu potom po stenách skúmavky pridáme 3 – 5 ml koncentrovanej kyseliny sírovej a sledujeme farebnú zmenu. Výluh sa po pridaní koncentrovanej kyseliny sírovej sfarbí na styčnej ploche na modro.
Pozorovanie:	Zaznamenáme farebnú zmenu.
Úloha 41:	Dôkaz vitamínu B₁
	1. Reakcia s kyselinou diazofenylsulfónovou
Princíp:	<p>Vitamín B₁ (tiamín) patrí do skupiny vitamínov B rozpustných vo vode. Fosforylovaný vystupuje ako koenzým dekarboxylázy a dehydrogenázy kyseliny pyrohroznovej. Dáva farebnú reakciu s kyselinou diazofenylsulfónovou, čo sa využíva na jeho dôkaz.</p>
	 <p style="text-align: center;">tiamín</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. 4 % roztok hydroxidu sodného 2. 5,76 % roztok uhličitanu sodného 3. diazoreagencia (0,9 g kyseliny sulfanilovej v 9 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej doplníme destilovanou vodou do 100 ml. Tento základný roztok uchovávame v tmavej fľaši. Z neho odpipetujeme 1,5 ml do 50 ml banky, ktorú držíme v ľade, pridáme 1,5 ml 5 % dusitanu sodného a po 5 minútach ešte 5 ml dusitanu sodného. Po minúte doplníme po značku. Roztok necháme v ľade ešte 15 minút. Takto pripravená reagencia vydrží 24 hodín.)

	4. 0,1 % tiamín okyslený kyselinou chlorovodíkovou na pH 3 až 4
Materiál:	skúmavky, stojan na skúmavky, mikropipety
Postup:	Do skúmavky napipetujeme 1 ml zmesi hydroxidu sodného a uhličitanu sodného v pomere 1:1, prikvapneme 10 – 12 kvapiek diazoreagencie a 2 – 4 kvapky tiamínu. Počiatočné žlté sfarbenie sa zmení za niekoľko minút na oranžové.
Pozorovanie:	Zaznamenáme farebnú zmenu.
2. Reakcia s hexakvanoželezitanom draselným	
Reagencie:	1. 1 % roztok hexakvanoželezitanu draselného 2. 30 % hydroxidu draselného 3. n-butanol 4. 0,1 % roztok vitamínu B ₁
Materiál:	skúmavky, stojan na skúmavky, pipety
Postup:	Do skúmavky k 1 ml vitamínu B ₁ pridáme 2 ml hexakvanoželezitanu draselného, 1 ml KOH a po zamiešaní 5 ml n-butanolu. Po dôkladnom pretrepaní horná vrstva fluoreskuje pod UV lampou (pri 254 nm).
Pozorovanie:	Zaznamenáme farebnú zmenu.
Úloha 42:	Dôkaz vitamínu C
Princíp:	<i>Vitamín C plní v ľudskom organizme mnohé dôležité funkcie – je súčasťou antioxidantného systému, je nutný pre normálnu imunitnú odpoveď na infekcie, pre hojenie rán a podobne. Priemerná denná dávka pre zdravého dospelého človeka by mala byť asi 100 mg.</i> <i>Uvedený dôkaz vitamínu C je založený na jeho redukčných schopnostiach. Kyselina askorbová zredukuje hexakvanoželezitan draselný na hexakvanoželeznatan draselný a ten utvorí so železitým kationom berlínsku modrú (hexakvanoželeznatoželezitan draselný). Takto možno polokvantitatívne sledovať obsah vitamínu C v jednotlivých druhoch ovocia a zeleniny (intenzita sfarbenia je relatívne úmerná obsahu vitamínu C).</i>
Reagencie:	1. zmes 1 % roztoku hexakvanoželezitanu draselného a 1 % roztoku chloridu železitého 2. vitamín C 3. plátky rôznych druhov ovocia (najlepšie citrusového)
Materiál:	skúmavky, stojan na skúmavky, pipety
Postup:	Zmes hexakvanoželezitanu draselného a chloridu železitého kvapneme na tenký plátok ovocia a pre porovnanie aj do skúmavky s roztokom vitamínu C. Pôvodne olivovo-zelené sfarbenie sa zmení v prítomnosti vitamínu C na modré.
Pozorovanie:	Zaznamenáme farebnú zmenu.

Praktické cvičenia z biochémie

Vysokoškolský učebný text

Autori: doc. RNDr. Erik Sedlák, DrSc.
RNDr. Rastislav Varhač, PhD.,
RNDr. Patrik Danko, PhD,
doc. RNDr. Helena Paulíková, CSc.
prof. Ing. Dušan Podhradský, DrSc.

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
Vydavateľstvo ŠafárikPress

Rok vydania: 2020
Počet strán: 154
Rozsah: 8,9 AH
Vydanie: prvé



ISBN 978-80-8152-902-3 (e-publikácia)