

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Kateřina Riegelová

Enzymy podílející se na metabolismu škrobu
Enzymes which take part in the metabolism of starch

Bakalářská
práce

Vedoucí závěrečné práce / Školitel:
doc. RNDr. Helena Ryšlavá CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28.5.2012

Podpis

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Heleně Ryšlavé CSc. za cenné rady a odborný dohled při vykonávání práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Veronice Doubnerové Ph.D. Nemohu opomenout ani rodinu a přátele, kteří mě po celou dobu studia podporovali a byli mi oporou.

OBSAH

Seznam použitých zkratk.....	6
Abstrakt.....	7
Abstract.....	8
1. Úvod.....	9
1.1 Autotrofní a heterotrofní organismy	9
1.1.1 Autotrofní organismy	9
1.1.2 Heterotrofní organismy	9
1.2 Sacharidy	9
1.2.1 Syntéza sacharidů fotosyntézou.....	10
1.2.2 Rozdělení sacharidů podle počtu sacharidových jednotek.....	14
1.2.2.1 Monosacharidy	14
1.2.2.2 Oligosacharidy.....	15
1.2.2.3 Polysacharidy.....	16
1.2.3 Rozdělení sacharidů podle funkce	17
1.2.3.1 Transportní sacharidy	17
1.2.3.2 Strukturní sacharidy.....	19
1.2.3.3 Zásobní sacharidy	21
1.3 Škrob	23
1.3.1 Význam škrobu.....	23
1.3.2 Vlastnosti škrobu	23
1.3.2.1 Amylosa.....	24
1.3.2.2 Amylopektin	25
1.3.3 Metabolismus škrobu.....	25
1.3.3.1 Anabolismus škrobu	26
1.3.3.2 Katabolismus škrobu	28
1.3.3.3 Metabolismus asimilačního škrobu	29
2 Cíl práce.....	31
3 Materiál a metody	32
3.1 Rostlinný materiál	32
3.2 Chemikálie.....	32

3.3	Pufry	32
3.4	Přístroje	32
3.5	Příprava enzymu.....	33
3.5.1	Stanovení enzymové aktivity	33
3.5.1.1	Stanovení enzymové aktivity v závislosti na teplotě.....	34
3.5.1.2	Stanovení množství produktu v závislosti na čase	34
3.5.1.3	Stanovení enzymové aktivity v závislosti na pH.....	35
3.5.1.4	Stanovení enzymové aktivity v závislosti na druhu pufru.....	35
4	Výsledky	37
4.1	Závislost aktivity α-amylasy a fosforylasy na pH	38
4.1.1	Vliv pH na štěpení škrobu v citrátfosfátových pufrech	38
4.1.2	Vliv pH na štěpení škrobu ve fosforečnanových pufrech	39
4.1.3	Vliv pH na štěpení škrobu v borátových pufrech	40
4.2	Závislost štěpení škrobu na čase.....	41
4.3	Vliv teploty na štěpení škrobu	43
5	Diskuse	44
6	Závěr	45
7	Literatura	46

Seznam použitých zkratek

3-PGA	3-fosfoglyceraldehyd
AMP	Adenosinmonofosfát
ATP	Adenosintrifosfát
DTT	dithiothreitol
EDTA	Ethylediamintetraoctová kyselina
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid fosfát
PVP	Polyvinypolypyrrolidon
UDP	Uridindifosfát
UTP	Uridintrifosfát

Není-li uvedeno jinak, jsou veškeré sacharidy v konfiguraci D.

ABSTRAKT

Škrob je uložen v plastidech zásobních orgánů rostlin nebo v chloroplastech fotosyntetických pletiv. Tento zásobní polysacharid může být degradován hydrolyticky α -amylasami (EC 3.2.1.1.) nebo fosforolyticky fosforylasami (EC 2.4.1.1.). Extrakt připravený z listů tabáku (*Nicotiana tabacum L.*) štěpil barevný škrobový substrát. pH optimum hydrolytického štěpení bylo pH 8,0, pH optimum fosforolytického štěpení pH 7,4. Rychlost štěpení škrobu byla nejvyšší při teplotě 55 °C. Pro štěpení škrobu v listech tabáku má větší význam α -amylasa než fosforylasa.

ABSTRACT

Starch is stored in plastids of plant storage organs or in chloroplasts of photosynthetic tissues. This storage polysaccharide can be degraded hydrolytically by α -amylases (EC 3.2.1.1.) or phosphorolytically by phosphorylases (EC 2.4.1.1.). An extract prepared from tobacco leaves (*Nicotiana tabacum L.*) was found to disintegrate the dye-labeled starch substrate. The optimal pH of the hydrolytic cleavage was 8.0, while the optimal pH of the phosphorolytic cleavage was 7.0. The highest starch cleavage rate was observed at 55 °C. α -amylase is more important for cleavage of starch in tobacco leaves than phosphorylase.

1. Úvod

1.1 Autotrofní a heterotrofní organismy

Základními způsoby metabolismu podle zdroje přijímaného uhlíku jsou heterotrofie a autotrofie.

1.1.1 Autotrofní organismy

Autotrofní organismy získávají energii buď oxidací anorganických látek (chemolitotrofní bakterie) nebo zachycují světelnou energii, kterou využívají k syntéze látek organických z látek anorganických jako jsou CO_2 , dusičnan a síran. Celá rostlina je autotrofní jen u vývojově nejnižších rostlin. [1]

1.1.2 Heterotrofní organismy

Heterotrofní organismy nebo buňky získávají zdroj uhlíku, který je nezbytný pro jejich život, z organických sloučenin, které vyrábějí zelené rostliny v procesu fotosyntetické asimilace. Nejsou schopny syntetizovat organické látky z látek anorganických. Část organických látek oxidují na látky s nízkým obsahem energie (CO_2 , H_2O) a získanou energii využívají k zajištění životních dějů.

U rostlin mají heterotrofní způsob výživy jak některé nezelené rostliny, tak i mladé klíčící rostlinky zelených rostlin, neboť nemají vyvinuté zelené asimilační listy nebo zelené dělohy. I orgány zelených rostlin, které nemají chlorofyl, se vyživují heterotrofně, např. kořeny, květy, plody a některá pletiva.

1.2 Sacharidy

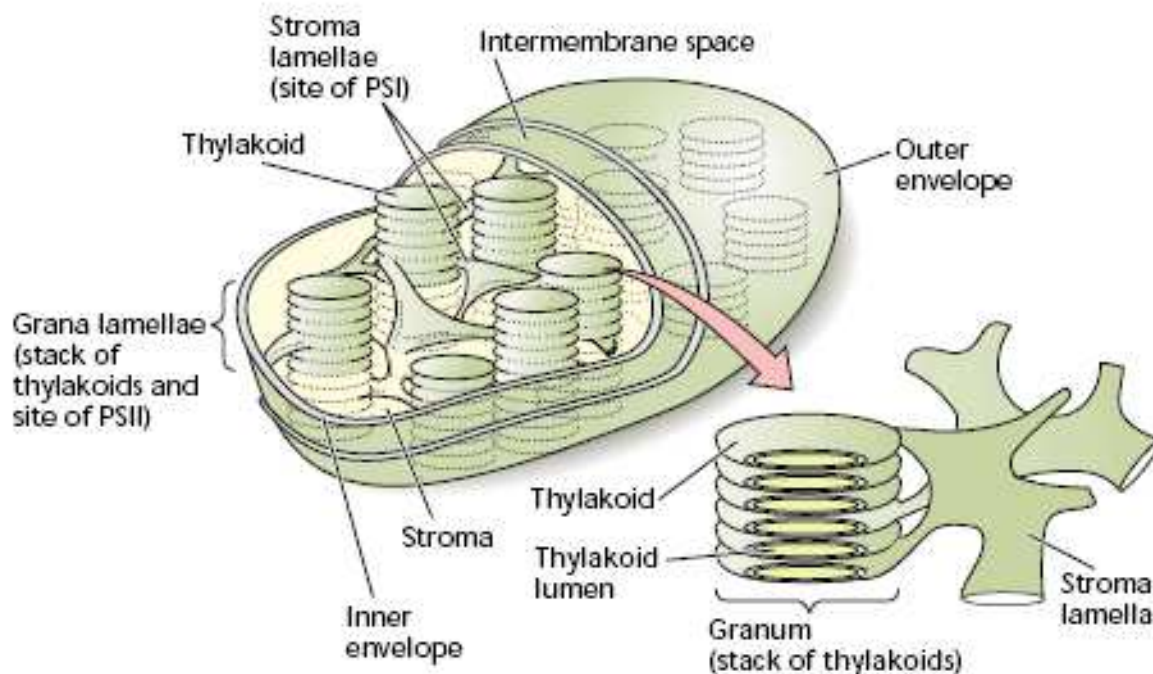
Sacharidy jsou základní složkou všech živých organismů. Spolu s bílkovinami a tuky se řadí mezi hlavní živiny. Základní stavební jednotku sacharidu tvoří monosacharid. Chemickým složením patří mezi polyhydroxyaldehydy či polyhydroxyketony, které mají alespoň tři alifatické uhlíky.[2] Sacharidy slouží jako zdroj energie a stavební jednotky buněk stejně jako glykoproteiny, hormony, vitamíny. Sacharidy jsou ve značné koncentraci

v rostlinných buňkách, v některých rostlinných orgánech jich je v sušině až 90 %. Význam sacharidů v přírodě je obrovský. Jako energetický zdroj v metabolismu se sacharidy ukládají ve formě polysacharidů v organismech jako rezervní látky, u rostlin v hlízách a kořenech.

1.2.1 Syntéza sacharidů fotosyntézou

Sacharidy vznikají v autotrofních organismech biochemickým procesem – fotosyntézou, jejíž produktem je triosafosfát (=dihydroxyacetonfosfát, glyceraldehydfosfát). Fotosyntéza představuje z fyzikálního hlediska přeměnu energie ze slunečního záření na chemickou energii. Tímto způsobem rostliny vytváří různé metabolity jako jsou sacharidy, lipidy, nukleové kyseliny a proteiny. Pro všechny tyto procesy je CO_2 používán jako výchozí látka. [3]

Zásadní organela při fotosyntéze je chloroplast (Obr.1). V jedné buňce zeleného listu jich bývá 20 až 100. Každý chloroplast je ohraničený dvojitou membránou, která ohraničuje stroma. V ní je síť uzavřených membrán ve tvaru stlačených měchýřků, které se nazývají thylakoidy. Thylakoidy mají vrstevnatou strukturu.

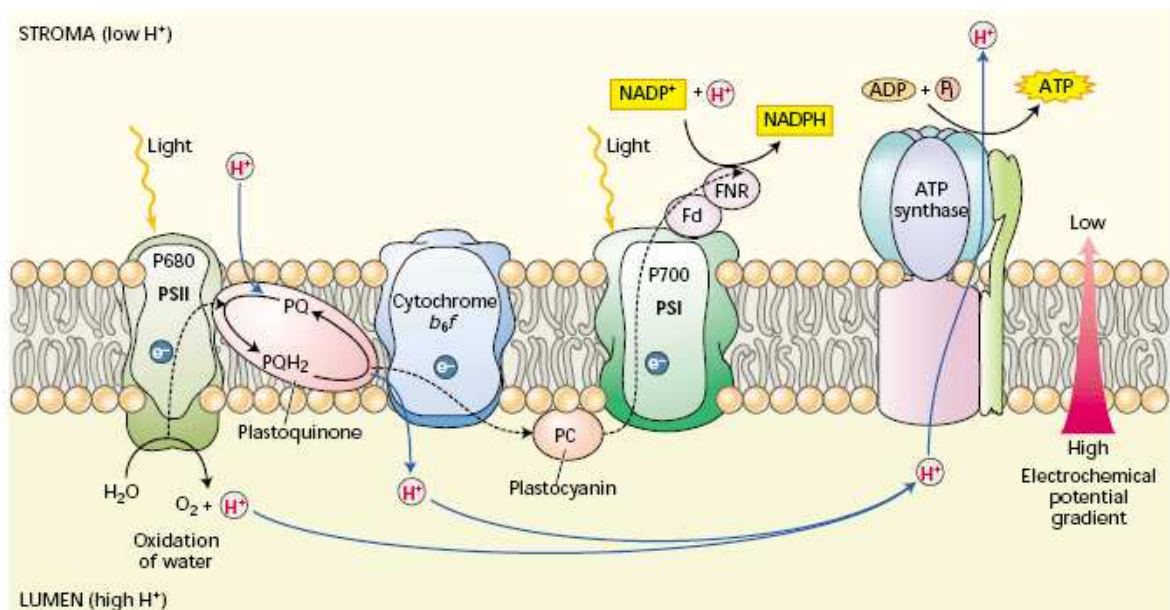


Obr.1.: Struktura chloroplastu [1]

Na sebe naskládané thylakoidy tvoří grana, která jsou pro vysoký obsah chlorofylu intenzivně zelená a proto jsou schopná absorbovat dopadající světlo.

Chemicky je fotosyntéza náročný proces, při kterém se musí převést uhlík v podobě CO_2 v oxidované formě na redukovanou formu uhlíku - sacharidy.[4] Fotosyntéza je endergonický redukční proces, který se skládá ze dvou na sebe navazujících hlavních částí. První neboli světelná fáze je podmíněná energií slunečního záření. Fotony dopadají na chlorofyl v chloroplastech rostlin. Energie fotonů štěpí vodu na kyslík a vodík, který redukuje NADP^+ na $\text{NADPH} + \text{H}^+$ na vnější straně thylakoidů. Gradient protonů je využit k syntéze ATP přes komplex ATP-synthasy. Produkty světelné fáze jsou spotřebovávány v druhé fázi k syntéze sacharidů z CO_2 . [1]

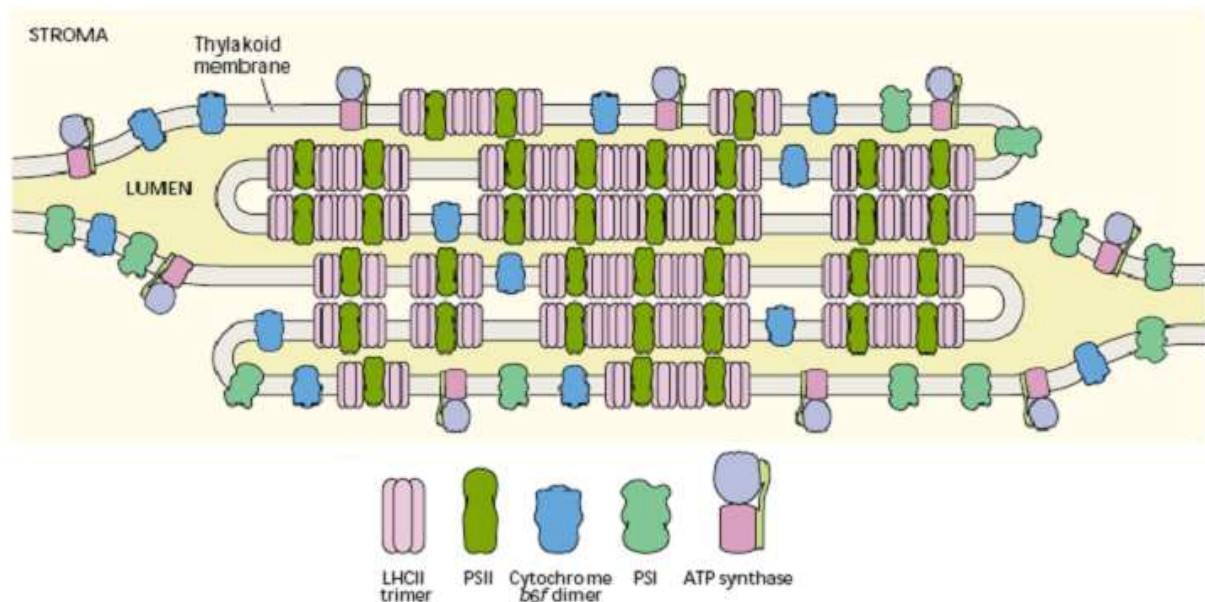
V thylakoidní membráně chloroplastu (obr.2) jsou umístěny pigment-proteinové komplexy fotosystémů (fotosystém I a II - PSI a PSII) a jejich světlosběrné komplexy (Light Harvesting Complexes - LHC). Každý fotosystém má své reakční centrum. Reakční centrum má několik molekul chlorofylu, vázaných na bílkovinu. Mezi fotosystémy jsou umístěny elektronové přenašeče – plastochinony, cytochromové přenašeče.



Obr.2.: Schéma fotosyntézy v chloroplastu rostlin s přenosem vodíkových protonů a tvorbou ATP. PS II – fotosystém II, PS I – fotosystém I. Přenos vodíkových proteinů znázorněn modrou křivkou. Vpravo enzym ATP-asa směřující kulovitým útvarům do stromatu a využívající energii uvolňovanou při zpětném toku protonů po jejich spádu zpět do stromatu pro tvorbu ATP. [1]

Sluneční energie je zachycena světlosběrnými komplexy, předána do reakčního centra fotosystémů a zde dochází vlivem energie fotonů k excitaci molekul chlorofylu. Z excitovaných molekul chlorofylu se uvolňují elektrony s vysokou energií a ty jsou předávány přes plastochinony na komplex cytochromů b_6/f . Dále putují přes plastocyanin do fotosystému I.

Přeměna energie je založena na transportu elektronů společně s transportem protonů přes membránu. Tímto způsobem je energie excitovaných elektronů uchovávána jako elektrochemický vodíkový potenciál. Fotosyntetické reakční centrum a hlavní komponenty elektronového transportního řetězce jsou vždy lokalizovány na thylakoidní membráně (Obr.3). [1]

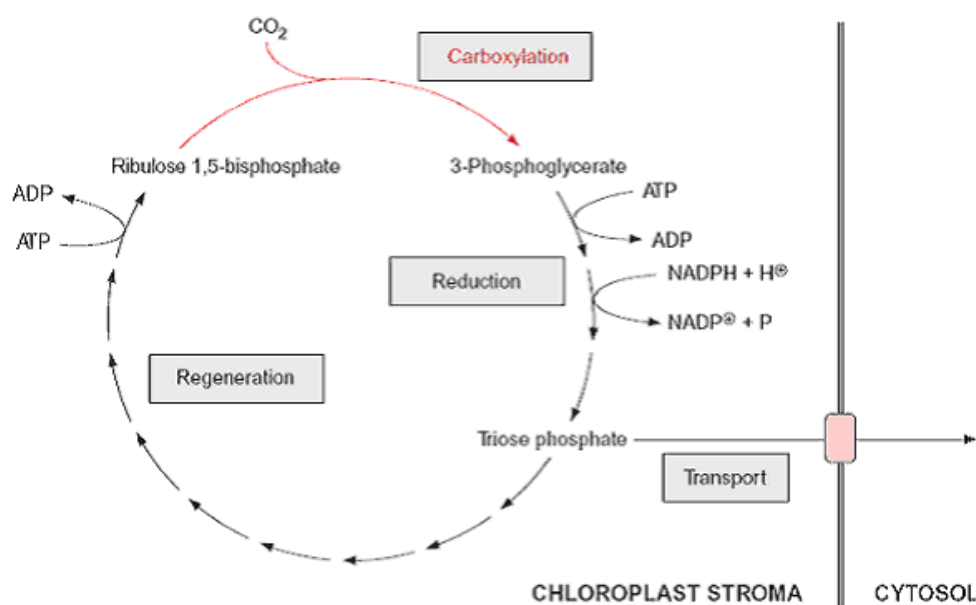


Obr.3.: Uspořádání hlavních částí fotosyntézy na membráně chloroplastu

Reakce umožňující vznik triosafosfátu z CO_2 , ATP a NADPH byly dříve nazývány temnostní fází fotosyntézy, neboť tyto reakce jsou na světle nezávislé, tudíž by teoreticky mohly probíhat v noci. Ve skutečnosti tyto reakce v noci v listech neprobíhají, protože některé enzymy tohoto cyklu jsou díky regulačním procesům aktivní pouze během světla.[1] Celkově se na fixaci jedné molekuly CO_2 spotřebují 3 molekuly ATP a 2 molekuly redukovaného $\text{NADPH}+\text{H}^+$.

Oxid uhličitý slouží jako zdroj uhlíku pro buňku, spolu se zdroji N a P a minerálními ionty K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ je využíván pro buněčný růst a syntézy.[5] Fixace CO_2 probíhá Calvinovým cyklem. Calvinův cyklus se skládá ze 3 fází (Obr.4.): fixace CO_2 na ribulosa-

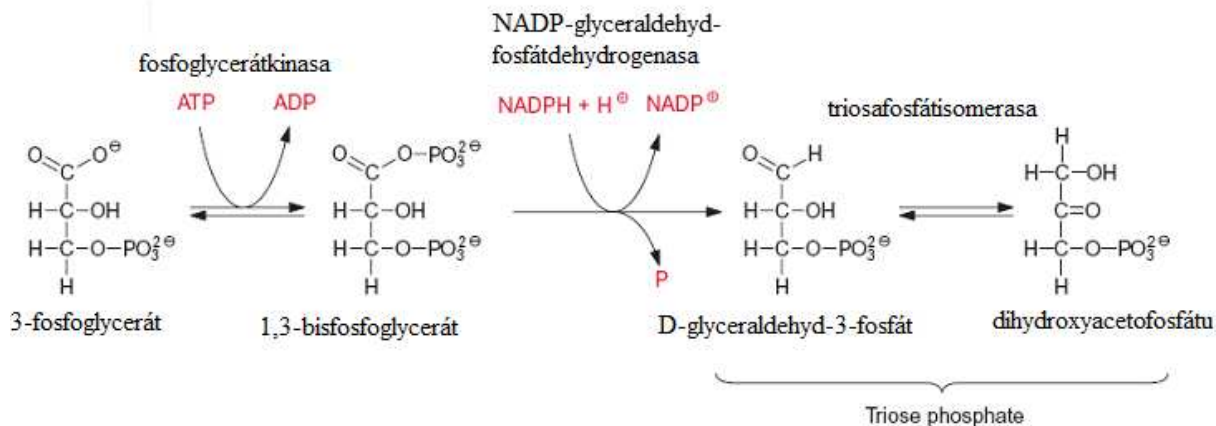
1,5-bisfosfát vedoucí ke vzniku 2 molekul 3-fosfoglycerátu, redukce 3-fosfoglycerátu na triosafosfát a regenerace akceptoru CO₂ – ribulosa-1,5-bisfosfátu.[6] Klíčovým enzymem cyklu je ribulosabisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (dále jen RuBisCo, EC 4.1.1.39). Oxygenasová aktivita katalyzuje vedlejší reakci, kdy dochází k reakci s O₂ za vzniku jedné molekuly 3-fosfoglycerátu a jedné molekuly 2-fosfoglykolátu [1]. RuBisCo katalyzuje první fázi Calvinova cyklu - karboxylaci ribulosa-1,5-bisfosfátu. RuBisCo se skládá z 8 velkých (katalytických) a 8 malých podjednotek tvořících hexadekamer. RuBisCo je nejhojnějším enzymem v přírodě a zároveň jediným enzymem, který umožňuje fixaci atmosférického CO₂ pro vznik biomasy [1]



Obr.4.: Schématické znázornění tří hlavních fází Calvinova cyklu – karboxylace, redukce a regenerace.[1]

3-fosfoglycerát je fosforylován fosfoglycerátkinasou (EC 2.7.2.3) na 1,3-bisfosfoglycerát (Obr.5) V této reakci se spotřebuje jedna molekula ATP a NADPH+H⁺. Vysoký stupeň NADPH+H⁺ v chloroplastech (50-60%, redukováný) dovoluje účinnou redukci 1,3-bisfosfoglycerát enzymem NADP-glyceraldehydfosfátdehydrogenasu (EC 1.2.1.13) na glyceraldehyd-3-fosfát. Triosafosfátisomerasa (EC 5.3.1.1) katalyzuje izomerizaci glyceraldehyd-3-fosfátu na dihydroxyacetonfosfát. Tato přeměna aldosu v ketosu probíhá přes 1,2-enediol jako meziprodukt a v podstatě je podobná reakci katalyzované ribosafosfátisomerasami (EC 5.3.1.6). Rovnováha reakce je ve prospěch ketonu. Triosafosfatasy (celkové) tvoří 96% dihydroxyacetonfosfátu a pouze 4% glyceraldehyd-3-fosfátu. Fixace 3 molekul CO₂ Calvinovým cyklem je spojena se syntézou 6 molekul 3-

fosfoglycerátu, které jsou přeměněny na 6 molekul triosafosfátu. Z těch je pouze 1 molekula využitelná pro různé biosyntetické procesy buňky. Zbývajících 5 triosafosfátů je nezbytných pro regeneraci 3 molekul ribulosa-1,5-bisfosfátu. [1]



Obr.5.: Druhá fáze Calvinova cyklu – redukce 3-fosfoglycerátu na triosafosfát (upraveno z [1])

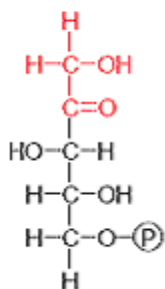
1.2.2 Rozdělení sacharidů podle počtu sacharidových jednotek

Sacharidy se rozdělují podle počtu sacharidových jednotek do tří skupin na monosacharidy s jednou sacharidovou jednotkou, oligosacharidy se 2-10 spojenými monosacharidy a na polysacharidy, které mají více než 10 jednotek.

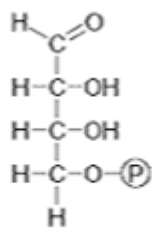
1.2.2.1 Monosacharidy

Monosacharidy jsou nejjednodušší cukry, které nelze dále rozložit. V rostlinné říši jsou součástí většiny biochemických procesů.

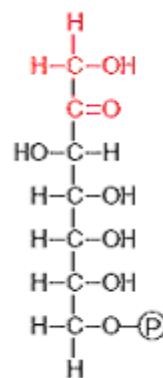
Některé monosacharidy, které vznikají během fotosyntézy byly zmíněny v kapitole 1.2.1. Ovšem v Calvinově cyklu vznikají další monosacharidy jako meziprodukty. Enzym transketolasa (EC 2.2.1.1) přenáší cukerný 2-uhlíkatý zbytek z fruktosa-6-fosfátu na glyceraldehyd-3-fosfát za vzniku xylulosa-5-fosfátu (Obr.6.) a erythrosa-4-fosfátu (Obr.6.) reverzibilní reakcí. Xylulosa-5-fosfát je prekurzor ribulosa-5-fosfátu. Z erythrosa-4-fosfátu vzniká sedoheptulosa-1,7-bisfosfát (Obr.6.).



Obr.6.: Xylulosa-5-fosfát



Erythrosa-4-fosfát



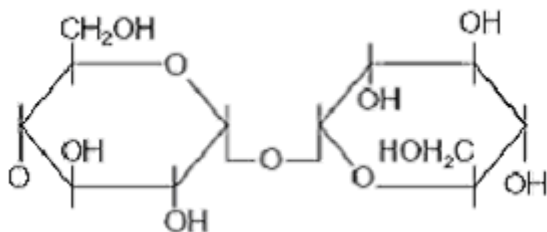
Sedoheptulosa-7-fosfát

Monosacharidy jsou i důležitou součástí buněčné stěny. Zástupci hexos jsou – β -D-galaktosa, β -D-glukosa, β -D-mannosa. Pentosy jsou β -D-xyloza, β -L-arabinosa a α -D-apiroza. Zástupci deoxymonosacharidů v buněčné stěně jsou α -L-rhamnosa a α -L-fukosa.[1]

1.2.2.2 Oligosacharidy

Dva monosacharidy mohou být vázány O-glykosidovou vazbou, čímž se mohou řetězit monosacharidové jednotky do vyšších celků. Oligosacharid vzniká vždy z reaktivní poloacetalové hydroxylové skupiny jedné molekuly monosacharidu s poloacetalovou nebo jinou hydroxylovou skupinou druhého monosacharidu. Podle druhu glykosidické vazby se disacharidy dělí na redukující - vyznačují se přítomností glykosidové vazby mezi atomem C1 jednoho monosacharidu a atomem C4 druhého monosacharidu (laktosa, maltosa) a neredučující - vyznačují se přítomností glykosidové vazby mezi atomem C1 jedné molekuly monosacharidu a atomem C1 druhé aldosa nebo atomem C2 ketosa (trehalosa, sacharosa). Každá molekula oligosacharidu obsahuje 2-10 monosacharidových jednotek.

Trehalosa (Obr.7) je oligosacharid skládající se ze dvou molekul glukosy spojených 1,1–vazbou. Trehalosa a trehalosafosfát jsou důležité signální metabolity podílející se na účasti regulace metabolismu u rostlin - v rostlinách stimulují syntézu škrobu, zvyšují odolnost vůči suchu a podílejí se na ovlivňování kvetení a maturace embryí. Mechanismy těchto reakcí musí být ještě objasněny. Trehalosafosfát vzniká syntézou glukosa-6-fosfátu a UDP-glukosy, díky enzymu trehalosafosfátsynthasa (EC 2.4.1.15). Trehalosa vzniká z trehalosafosfát za odštěpení UDP pomocí trehalosafosfátfosfatasy (EC 3.1.3.12). [1]



Obr. 7.: Molekula threhalosy

Další z řady disacharidů je sacharosa (viz kapitola 1.2.4.), která se skládá z jedné molekuly glukosy a jedné molekuly fruktosy. Sacharosa je bílá krystalická látka. Sacharosa neboli řepný či třtinový cukr je neredukující disacharid, který se hojně vyskytuje v rostlinách. Používá se v potravinářství jako nejběžnější sladidlo (potravinářský cukr).[7] Chemický zápis sacharosy je O- β -D-fruktofuranosyl- α -D-glukopyranosid. Obě oxoskupiny jsou skryté v acetalové formě, kruhy se tedy nemohou otvírat, a proto je sacharosa neredukující cukr [4].

Maltosa neboli sladový cukr se uvolňuje při klíčení ječmene tzv. hydrolýzou škrobu. Patří mezi redukující disacharidy. Spolu s isomaltosou se uvolňuje při trávení škrobu a glykogenu. Její molekula se skládá ze dvou molekul glukosy spojených $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidovou vazbou.[2]

1.2.2.3 Polysacharidy

Polysacharidy jsou řazeny mezi vysokomolekulární látky, které se skládají z více než 10 monosacharidových jednotek. Vznikají kondenzací cukerných jednotek; tvoří se tak různě dlouhé lineární nebo větvené řetězce.[4] Některé polysacharidy jsou rozpustné ve vodě a tvoří koloidní roztoky nebo bobtnají, jiné jsou zcela nerozpustné. Většina sacharidů nalezených v přírodě se vyskytuje jako polysacharidy o vysoké molekulové hmotnosti. Z polysacharidů vznikají kyselou či enzymatickou hydrolýzou monosacharidy, nebo jejich jednoduché deriváty.

Polysacharidy můžeme dělit na homopolysacharidy, které jsou tvořeny z monosacharidové jednotky jediného druhu, a heteropolysacharidy, které vznikají kombinací různých monosacharidů.[4]

1.2.3 Rozdělení sacharidů podle funkce

Sacharidy jsou jedny ze základních rostlinných přírodních látek, které můžeme dělit podle jejich specifické funkce do tří skupin – transportní, strukturní, zásobní.

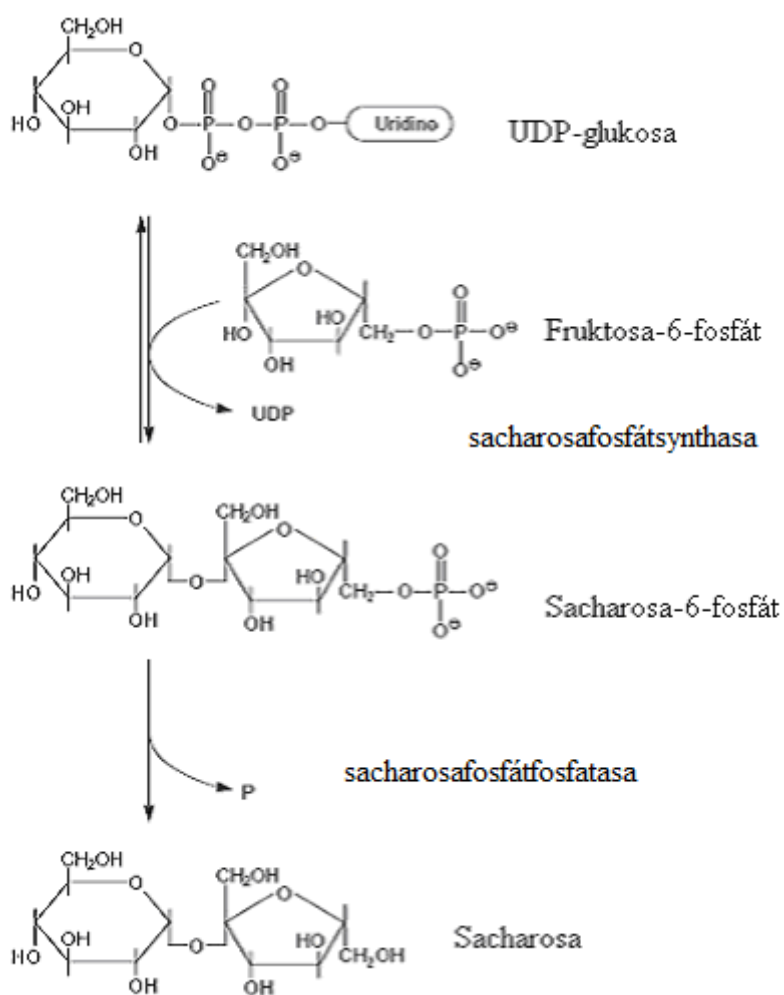
1.2.3.1 Transportní sacharidy

Hlavní transportní sacharid rostlin je sacharosa. Syntéza sacharosy (Obr.8) vychází z Glu-1-fosfátu a UTP, kdy vzniká UDP-glukosa pomocí UDP-glukosapyrofosforylasy (EC 2.7.7.9). Poté sacharosafosfátsyntasa (EC 2.4.1.14) přenáší glukosový bytek z UDP-glukosy na fruktosa-6-fosfát za vzniku sacharosa-6-fosfátu. Sacharosafosfátfosfatasa (EC 3.1.3.24) hydrolyzuje sacharosa-6-fosfát na sacharosu a tím odvádí produkt reakce katalyzované sacharosafosfátsyntasou a vzdaluje ji tak dosažení rovnováhy. Celkově je reakce syntézy sacharosy irreverzibilním procesem. Vedle sacharosafosfátsynthasy, rostliny obsahují i sacharosasyntasu (EC 2.4.2.13), katalyzující reverzibilní přeměnu UDP-glukosy a fruktosy na sacharosu a UDP. Tato reakce primárně není součástí syntézy sacharosy, ale slouží pro vznik UDP-glukosy a fruktosy z UDP a sacharosy. Sacharosasyntasa se nachází především v nefotosyntetických částech rostlin. Je např. součástí rozkladu sacharosy v amyloplastech zásobních tkání, např. hlíz brambor, což vede k podpoře syntézy škrobu. Také se účastní syntézy celulosy a kalosy. Do buněk se sacharosa dostává buď přes sacharosový přenašeč, nebo může být vně buňky rozštěpena extracelulární invertasou na fruktosu a glukosu, které jsou do buňky přeneseny přes hexosový přenašeč.[8] Sacharosa je syntetizovaná v cytosolu mezofylových buněk.[9] V buňce je sacharosa štěpena invertasou (EC 3.2.1.26) na glukosu a fruktosu nebo sacharosasyntasou na UDP-glukosu a fruktosu. Glukosa i fruktosa jsou následně fosforylovány hexokinasami a glukosa-6-fosfát je převedena na fruktosa-6-fosfát glukosa-6-fosfátisomerasou (EC 5.3.1.9). Dále již pokračují klasické reakce glykolýzy. Sacharosa může ale být i zásobní sacharid rostlin, a to v kořenech.

Další transportní sacharidy jsou polyoly - cukerné alkoholy, které vedle sacharosy jsou vytvářeny jako primární produkty fotosyntézy.[10] Ty pak mohou být transportovány v rostlinném těle na delší vzdálenosti a mají mnoho rozmanitých funkcí: od přizpůsobení se buněk osmotickému stresu až po zhášeče volných radikálů.[11]

Nejrozšířenější polyolem je u rostlin mannitol. Jedná se o redukovanou formu mannosy se šesti uhlíky v řetězci. Prekurzory pro jeho syntézu jsou, podobně jako u sacharosy, triosafosfáty dávající vznik fruktosa-6-fosfátu, který je v dalším kroku izomerován na

mannosa-6-fosfát. Ten je následně NADPH-mannosa-6-fosfátreduktasou redukován na mannitol-1-fosfát, v posledním kroku defosforylovaném na mannitol.[12]



Obr.8.: Syntéza sacharosy [1]

Sorbitol je další zástupce polyolů. Je syntetizován ve fotosyntetických pletivech. O tomto cukerném alkoholu je známo méně než o mannitolu. Především je rozšířeným metabolitem u jabloně, hrušky a meruňky, dále také u jitrocele.[13] Jeho biosyntéza připomíná syntézu mannitolu. Sorbitol-6-fosfát vznikající z glukosa-6-fosfátu činností NAD-dependentní aldosa-6-fosfátreduktasy je v posledním kroku defosforylován fosfatasou na sorbitol.[14]

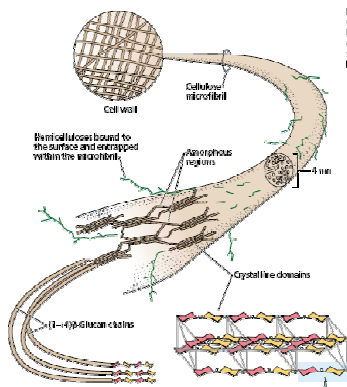
Další rostliny, jako je např. dýně, některé listnaté stromy (např. citronovník, líska, jilm a olivovník) sítkovicemi transportují oligosacharidy rafinosové řady. V těchto oligosacharidech je sacharosa spojena glykosidovou vazbou s jednou nebo více molekulami galaktosy. Mezi oligosacharidy rafinosové řady patří rafinosa s jednou molekulou galaktosy, stachyosa se

dvěma molekulami a verbaskosa se třemi molekulami glukosy. Tyto oligosacharidy také slouží jako zásobní látky a např. v semenech hrachu, nebo fazole představují 5-15% sušiny. Člověk nemá enzymy, které by katalyzovaly hydrolýzu α -galaktosidů, a proto nemůže oligosacharidy rafinosové řady trávit. K trávení těchto cukrů dochází až jejich rozložením anaerobními bakteriemi na konci střeva, kde jsou tyto cukry metabolizovány za uvolnění trávicích plynů.[1]

1.2.3.2 Strukturní sacharidy

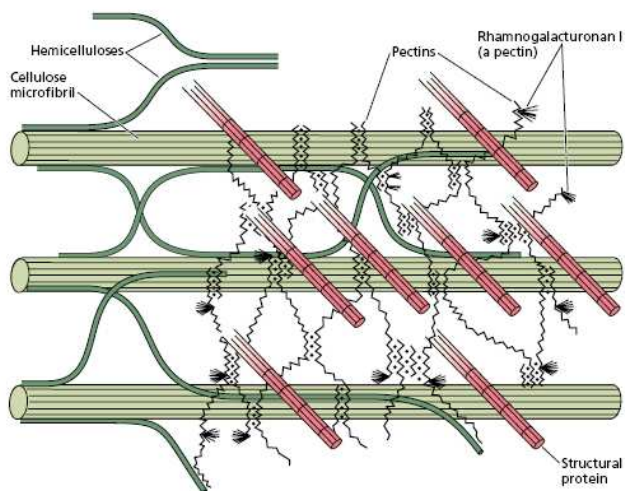
Strukturní sacharidy jsou většinou nerozpustné ve vodě, málo reaktivní z důvodu přítomnosti intermolekulárních vodíkových můstků, které je zpevňují. V rostlinné říši to jsou celulósa, hemicelulósa a pektin.

Nejrozšířenější strukturní sacharid je celulósa. Jedná se o lineární polysacharid, který váže více než polovinu uhlíku přítomného v atmosféře. Jednotky glukosy jsou vázány $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidovou vazbou, která umožňuje tvorbu dlouhých rovných řetězců na rozdíl od α -glykosidové vazby. Jednotlivé glukosy jsou oproti předcházející otočeny o 180° , kyslík pyranosového cyklu se účastní vodíkové vazby s hydroxylovou skupinou na C-3 následujícího monosacharidového zbytku.[9] Glukosové zbytky potřebné pro vznikající řetězec celulosy jsou dodávány ve formě UDP-glukosy. Ta je buď uvolněná z cytoplasmy, nebo se tvoří enzymem sacharosynthasa. Celulósa je syntetizována enzymy nacházejícími se na plazmatické membráně a nově vytvořený řetězec celulosy je vylučovaný do extracelulárního prostoru, kde tvoří buněčnou stěnu. Každý řetězec celulosy obsahuje 2000-25000 molekul glukosy (Obr.9). Celulósa nikdy nemá podobu jednoho řetězce, ale vždy okolo 36 řetězců tvořících mikrofibrilu, která je odolná vůči vodě, chemickým a biologickým vlivům. Předpokládá se, že díky mnoha sousedícím celulosasynthasám v membráně jsou všechny $\beta(1\rightarrow4)$ glukanové řetězce syntetizovány současně a do mikrofibrily se skládají samovolně.[1,4] V celulóse rozlišujeme krystalické a amorfí oblasti. V krystalických oblastech jsou řetězce navzájem vázány sekundárními vazbami, jedná se hlavně o vodíkové můstky. V amorfích oblastech celulosových vláken dochází k absorpci vody. Molekuly vody se v první fázi váží na volné hydroxylové skupiny pomocí vodíkových můstků. Další molekuly vody vytvářejí vodíkové můstky s již vázanými molekulami vody.

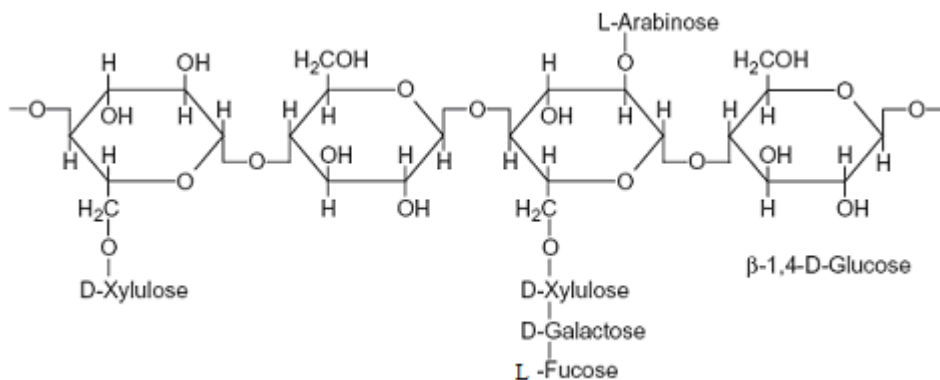


Obr.9.: Mikrofibrilové vlákno celulosy [1]

Hemicelulosa tvoří důležitou složkou buněčné stěny. Řadí se mezi polysacharidy, které tvoří prokřížení mezi vlákny celulosy (Obr.10.). Základní složkou je stejně jako u celulosy glukosa, na kterou se může vazbou $\alpha(1\rightarrow6)$ vázat xylosa (Obr.11.), na kterou pak dále mohou být navázány další molekuly sacharidů např. galaktosa a fukosa. Vazbou $1\rightarrow2$ může být glukosa spojena se zbytky různých hexos a pentos (např. arabinosa).[1] Různé zemědělské rostliny jako je kukuřice, pšeničné a rýžové stonky obsahují 20-40 % hemicelulosy.[15]

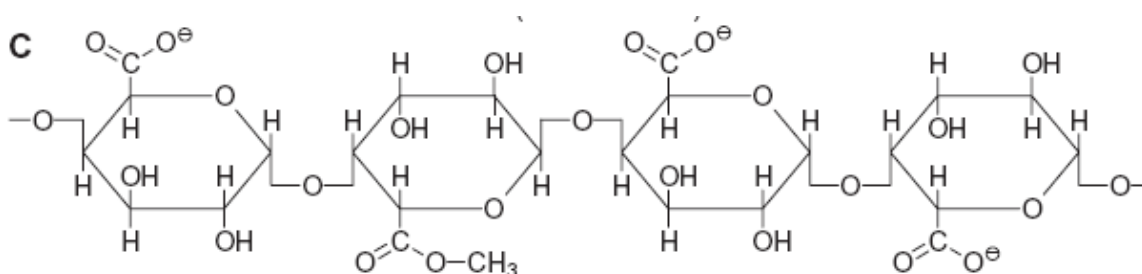


Obr.10.: Schématické znázornění a pravděpodobné uspořádání hlavních strukturálních komponent primární buněčné stěny. Mikrofibrily celulosy (světlezelené válečky) jsou obaleny hemicelulosami (tmavězelené). Pektiny (černě) jsou další spojovací prvek. [1]



Obr.11.: Vlákno hemicelulosity s navázanými molekulami galaktosy, fukosy a arabinosy [1]

Pektin (Obr.12.) je další významná složka buněčné stěny. Jedná se o směs polymerů kyselin odvozených od sacharidů, jako D-galaktouronová kyselina, která je spojena $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidickými vazbami. Některé karboxylové skupiny jsou esterifikované methylovými skupinami. Volné karboxylové skupiny postranních řetězců mohou vázat Mg^{2+} a Ca^{2+} ionty, jejichž přítomnost odpovídá za vlastnosti podobné lepidlu reverzibilně spojující sousední buňky dohromady. Pokud tyto ionty chybí, stává se pektin rozpustnou látkou. Pektiny se kromě buněčné stěny vyskytují také v buněčné šťávě vakuol.[1]



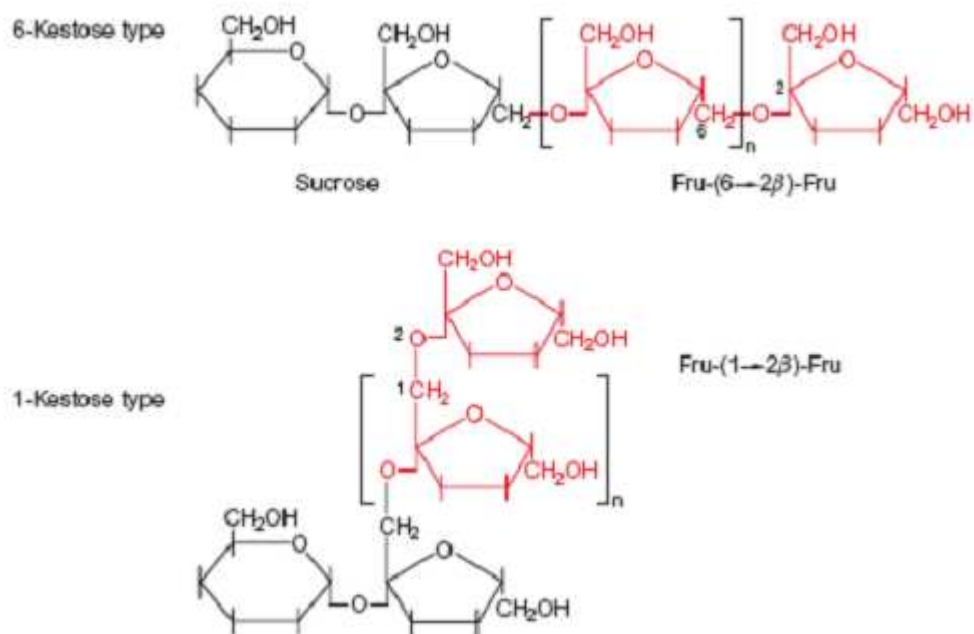
Obr.12.: Chemická struktura pektinu spojeného $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidickými vazbami[33]

1.2.3.3 Zásobní sacharidy

Rezervní polysacharidy tvoří zásobu chemické energie, které se v případě potřeby může uvolnit jejich odbouráváním. Ve vodě jsou rozpustné, což je způsobeno menším množstvím vodíkových můstků.

U rostlin mohou být zásobní polysacharidy fruktany - rozpustné polyfruktosy. (Obr.13.). Jejich syntéza probíhá ve vakuole, kde jsou i skladovány. Fruktany jsou také často skladovány v listech a stoncích mnoha obilovin mírného pásu, např. ječmene a pšenice. Fruktany rovněž

představují hlavní sacharid cibule a podobně jako rafinosové cukry jsou i fruktany pro člověka nestravitelné. Základní struktura trisacharidu fruktanu je sacharosa spojena s další molekulou fruktosy, a ta se nazývá kestosa. Jsou známe 3 typy fruktanů. V prvním typu je fruktosový zbytek glykosidicky vázán (6→2β) vazbami. To jsou fruktany 6-kestosového typu. Řetězce o různé délce (10-200 jednotek fruktosy) jsou prodlužovány dalšími zbytky fruktosy.



Obr.13.: Vzorec fruktanu 6-kestosového typu a 1-kestosového typu.[1]

Tyto fruktany se také nazývají fruktany levanového typu a často se nacházejí v travinách. V druhém typu jsou jednotky fruktosy ve jsou spojeny s molekulou sacharosy (1→2β) glykosidovými vazbami neboli fruktany 1-kestosového typu. Tyto fruktany také nazýváme fruktany inulinového typu a skládají se až z 50-ti molekul fruktosy. Třetí typ jsou neokestesové fruktany, kde jsou 2 polyfruktanové řetězce vázány k fruktosové molekule sacharosy, a to jeden pomocí (1→2β) glykosidové vazby a druhý (6→2β) glykosidovou vazbou se zbytkem glukosy molekuly sacharosy. Fruktany neokestesového typu jsou složeny pouze z 5-10 fruktosových jednotek.

Škrob je rostlinný zásobní polysacharid. Jednotlivé molekuly glukosy spolu interagují za vzniku škrobu (viz kap.1.3.5.), jelikož glukosa není vhodná jako zásobní sacharid k uskladňování z důvodu samovolné oxidace aldehydové skupiny na karboxylou. Navíc škrob nezvyšuje osmotický tlak jako jednotlivé molekuly glukosy.

1.3 Škrob

Škrob (lat. *amylum*) patří mezi nejdůležitější a nejrozšířenější polysacharidy s mnoha důležitými vlastnostmi. Škrob je homopolysacharid složen výhradně z glukosylových zbytků, které jsou spojeny pouze dvěma typy vazeb $\alpha(1\rightarrow4)$ a $\alpha(1\rightarrow6)$ vazbou.[3] Skládá se ze dvou hlavních částí – amylosy a amylopektinu. Během dne se shromažďuje v listech, kde probíhá fotosyntéza a v noci se využívá k podpoře buněčného dýchání a růstu.[14] Škrob vzniká jako hlavní metabolický produkt v plastidech listů zelených rostlin. V neautotrofních částech rostlin (kořeny, některá semena) slouží jako zásobní materiál.

1.3.1 Význam škrobu

Škrob má i ekonomický význam, neboť je druhý nejhojnější biopolymer na Zemi hned po celulóse a nejdůležitější polysacharid používaný v potravinářství a pro krmné účely.[14] Jako dostupný zdroj energie ho využívá široké spektrum organismů (vyšší rostliny, živočichové a mikroorganismy). Mezi rostliny s největším procentuálním zastoupením škrobu patří brambory, obiloviny, banány.

1.3.2 Vlastnosti škrobu

Škrob je bílý až nažloutlý prášek bez chuti a zápachu, ve studené vodě nerozpustný. Po chemické stránce je škrob makromolekulární látka s obecným chemickým vzorcem $(C_6H_{10}O_5)_n$. Základní stavební složkou je glukosa, která je primárně spojena $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidovými vazbami.[1] glukosa se opakuje tisíckrát až desettisíckrát. Kromě glukosy škrob obsahuje ještě malé množství lipidů, proteinů a přibližně 10-20 % vody. Nachází se především jako zásobní materiál v rostlinách v podobě nerozpustných micel nazývaných škrobová zrna (Obr.14) uložených v plastidech buněk semen, kořenů, hlíz a listů. Každá rostlina má charakteristická škrobová zrna, která se liší velikostí (1 μm -100 μm), tvarem (kulový, oválný, protáhlý, ledvinový tvar aj.), poměrem amylosy k amylopektinu, architekturou a dalšími rysy. [17]

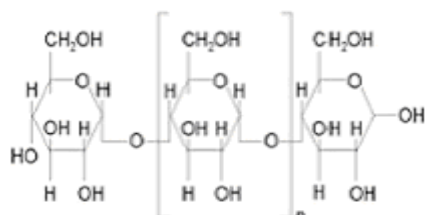


Obr.14.: Asimilační škrob v chloroplastu mezofylové buňky v listu tabáku na konci dne. Škrobové zrno se v chloroplastu jeví jako velká bílá plocha.[1]

Škrobová zrna listů jsou obrovská na konci dne a většinou jsou z velké části degradována v průběhu následující noci, kdy je škrob přeměněn na maltodextrin pomocí několika enzymů jako linearizační enzymy, glukán-H₂O dikinasa a fosfoglukán-H₂O dikinasa.[18] Takový škrob se nazývá asimilační škrob. Naproti tomu škrob zásobních orgánů (např. semen nebo hlíz) je uložen po delší časové období, a proto se nazývá zásobní škrob. [1]

1.3.2.1 Amylosa

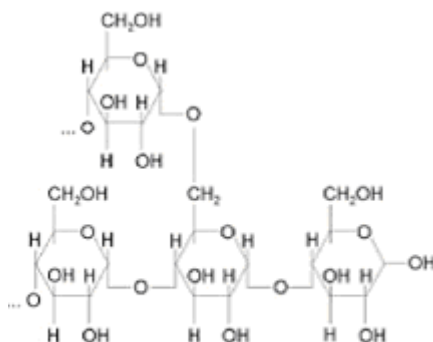
Amylosa (Obr.15) je lineární řetězec obsahující jednotky α -D-glukosy navzájem vázané vazbou $\alpha(1\rightarrow4)$ a proto je vlastně polymerem disacharidu maltosy, přičemž tento polymer má strukturu levotočivé šroubovice, do jejíhož nitra lze vázat až 20 % jódu. [19] Toho se využívá v analytické chemii při důkazech jódu [20]. V omezené míře dochází k větvení asi na deseti místech molekuly. Amylosa je částečně esterifikována kyselinou fosforečnou (pšeničný škrob obsahuje 0,055 % fosforu, bramborový 0,07 – 0,09 %), u obilných škrobů tvoří komplexy s lipidy. Relativní molekulová hmotnost amylosy je v rozmezí od 40 000 do 150 000 kDa [21]. V přírodě se nevyskytuje v čisté formě, ale je vždy doprovázena alespoň malým množstvím amylopektinu. Její zastoupení ve škrobech je většinou 20-30 %. Hrách, který používal G. Mendel na křížení hrachu, obsahoval dokonce 80 % amylosy. Kyselou hydrolyzou se štěpí amylosa na glukosu.[1,22]



Obr.15.: Chemický vzorec amylosy

1.3.2.2 Amylopektin

Amylopektin (Obr16) stejně jako amylosa má jednotlivé molekuly glukosy vázané vazbami $\alpha(1\rightarrow4)$, ale na rozdíl od amylosy netvoří lineární řetězec, ale je naopak přibližně na každé 20-25 molekule glukosy větvený vazbou $\alpha(1\rightarrow6)$, kdy stavební jednotkou je isomaltosa. Výjimečně se mohou vyskytovat vazby $\alpha(1\rightarrow3)$, kdy stavební jednotkou je laminaribiosa. Asi na 400 glukosových zbytků připadá jeden zbytek esterifikovaný kyselinou fosforečnou.[2] Rozvětvené části se mohou dále větvit. Jeho relativní molekulová hmotnost je řádově větší než u amylosy. Tvoří jej okolo 10^5 molekul glukosy, což ho řadí mezi největší makromolekuly v přírodě.[23] Jeho zastoupení ve škrobech je většinou 70-80 %. [1]



Obr.16.: Chemický vzorec amylopektinu

1.3.3 Metabolismus škrobu

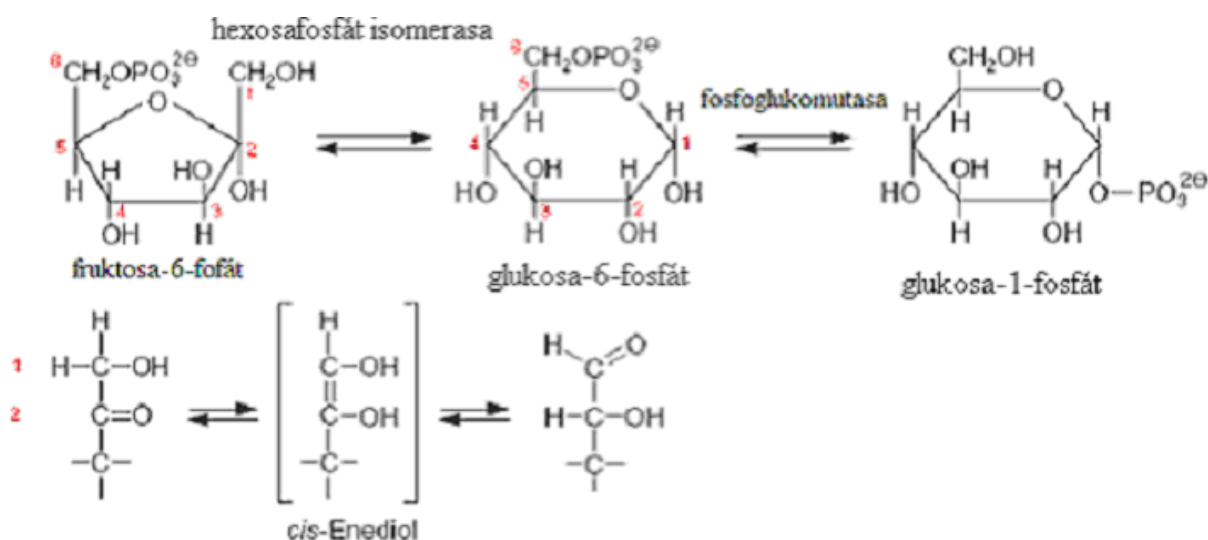
Syntéza škrobu z uhlíku vzniklého během fotosyntézy spotřebovává většinu metabolické aktivity rostlin.[24]

V minulosti byl metabolismus škrobu intenzivně studován. To vedlo k bohatým znalostem o metabolických drahách a enzymech podílejících se na metabolismu škrobu. Je však stále mnoho otevřených otázek týkajících se signálů a mechanismů regulace metabolismus

škrobu.[16] Syntéza a degradace škrobu vyžaduje účast mnoha enzymů, vyskytující se jak ve fotosyntetických tak nefotosyntetických pletivech. [25] Biochemie škrobu zahrnuje kooperaci 40 (iso)enzymů.[3]

1.3.3.1 Anabolismus škrobu

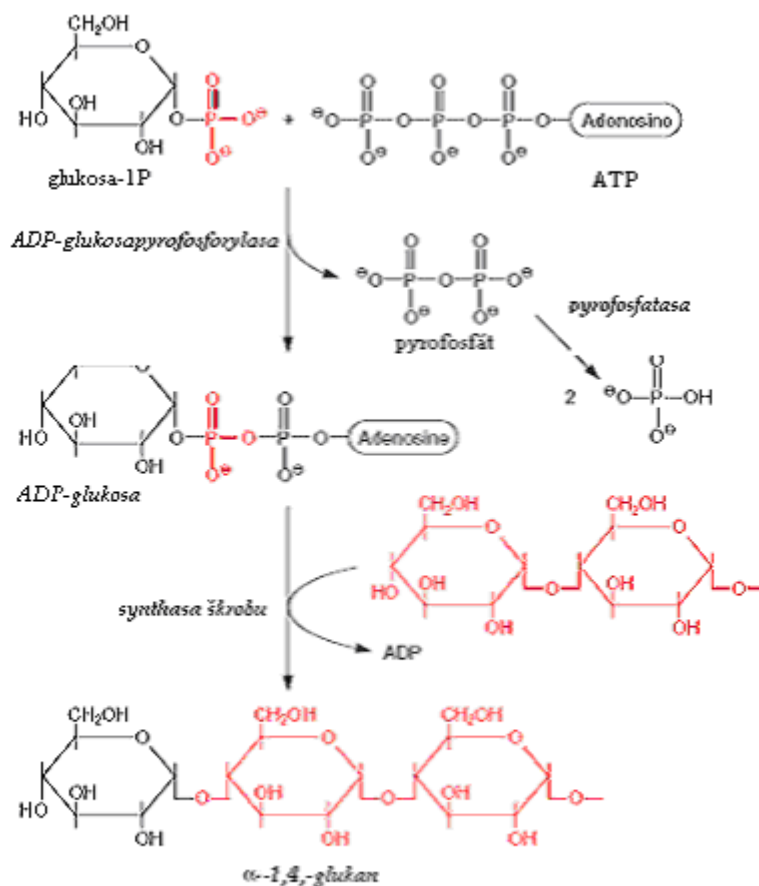
Syntéza zásobního škrobu je souhrnný proces, který se odehrává v buněčné organelle zvané amyloplast (asimilační škrob je syntetizován v chloroplastu, viz kap. 3.5.3.), kde z glukosy dochází, k vytvoření škrobových polymerů amylosy a amylopektinu. Biosyntéza škrobu vychází z Calvinova cyklu, kdy jeho meziproduct - fruktosa-6-fosfát se pomocí enzymu hexosafosfátisomery (EC 5.3.1.9) přeměnění na Glu-6-fosfát. Meziproductem reakce je cis-enediol. (Obr.17). Poté enzym fosfoglukomutasa (EC 2.7.5.1) přenáší fosfátový zbytek glukosy z pozice šest na pozici jedna, čímž vznikne glukosa-1-fosfát. [25]



Obr.17.: Přeměna fruktosa-6-fosfátu vzniklého v Calvinově cyklu na glukosa-1-fosfát.[1]

Další krok zahrnuje konverzi glukosa-1-fosfátu s ATP, které vzniká fotofosforylací na thylakoidní membráně, (Obr.18) na ADP-glukosu a anorganický pyrofosfát, katalyzovanou ADP-glukosapyrofosforylasou (EC 2.7.7.27), která se výhradně nachází v plastidech. Tato reakce je reverzibilní. Avšak díky vysoké aktivitě pyrofosfatasy ve stroma chloroplastů je ve výsledku vznik ADP-glukosy ireverzibilní proces, protože vznikající pyrofosfát je okamžitě hydrolyzován na fosfát, čímž se oddálí rovnovážný stav. Vzhledem k ireverzibilitě je krok vzniku ADP-glukosy vhodný pro regulaci syntézy škrobu.[16]

Avšak v poslední době byl tento krok hodně diskutován. Bylo navrženo, že ADP-glukosa je v listech syntetizována v cytosolu sacharosasyntasou, kdy jako substrát slouží ADP a sacharosa, a poté je importována do chloroplastu pro syntézu škrobu.[16,26] ADP-glukosapyrofosforylasa (EC 2.7.7.27) je klíčový regulační enzym v biosyntéze škrobu, který katalyzuje první krok.[27] Je inhibována anorganickým fosfátem a aktivována 3-fosfoglycerátem.[28] ADP-glukosa je přenesena syntasou škrobu (EC 2.4.1.21) na OH-skupinu koncové molekuly glukosy v pozici čtyři. Větve jsou tvořeny větvicími enzymy. V průběhu syntézy škrobu mohou být větve opět odštěpeny linearizačními enzymy (viz katabolismus škrobu). Předpokládá se, že aktivita větvicích a linearizačních enzymů určují stupeň větvení škrobu. Vysoký obsah amylosy ve sraštělých semenech hrachu je výsledkem poklesu aktivity větvicích enzymů v rostlinách, který vede k celkovému snížení obsahu škrobu.[1]



Obr.18.: Syntéza škrobu z glukosa-1-fosfátu (upraveno z [1])

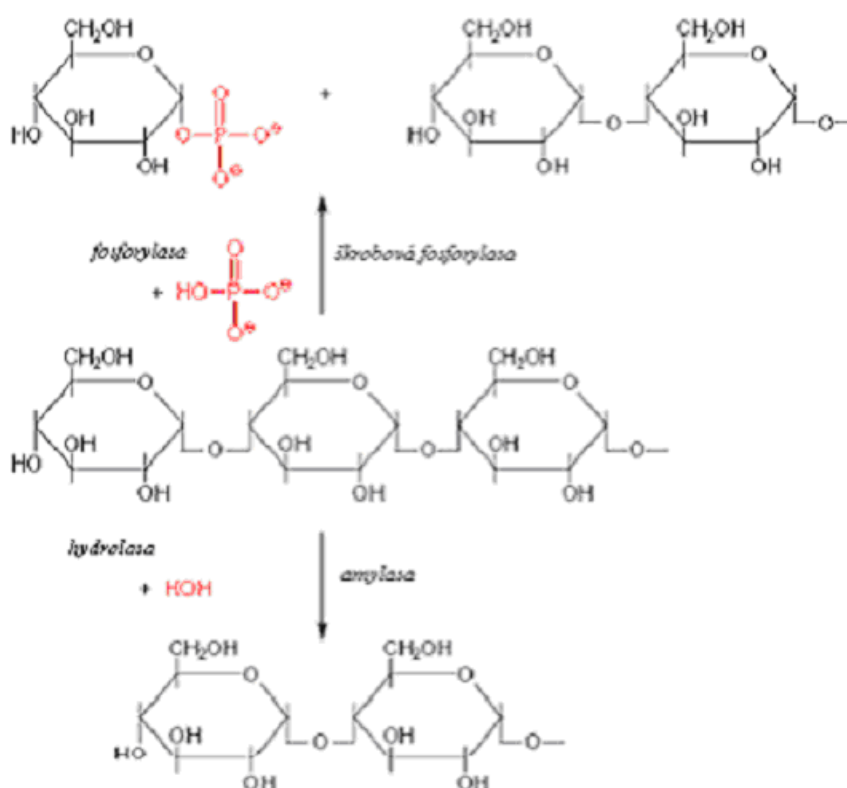
1.3.3.2 Katabolismus škrobu

Rostlina může štěpit škrob pomocí dvou odlišných enzymů – amylasy (EC 3.2.1.1.) a fosforylasy (EC 2.4.1.1.), kterými uvolňuje molekuly glukosy ze škrobu.

α -glukan fosforylasy celým názvem α -1 \rightarrow 4-D-glukan glukanofosforylasy je klíčový enzym glukanového katabolismu u živočichů, hub a prokaryot.[30] Zároveň může odbourávat škrob u rostlin, kde fosforolyticky štěpí α (1 \rightarrow 4) vazby z neredukujících konců škrobového řetězce za vzniku produktu glukosa-1-fosfátu (Obr.19).[29, 30]

Energie glykosidové vazby je uchována ve fosfoesterové vazbě. Bylo dokázáno, že degradace škrobu je zajištěna především α -amylasami.

α -amylasy, jejichž systematický název je α -1 \rightarrow 4-D-glukan glukanohydrolasy, dělíme na β -amylasy a α -amylasy. β -amylasy (EC 3.2.1.2.) hydrolyzují škrob od neredukujícího konce na molekuly maltosy – disacharid skládající se ze dvou molekul glukosy spojenými α (1 \rightarrow 4) vazbou. Jelikož –OH skupina na pozici jedna je v konfiguraci beta, je proto tak pojmenován i hydrolyzující enzym. α -amylasy (EC 3.2.1.1.), která štěpí škrob od středu řetězce α (1 \rightarrow 4) glykosidové vazby na oligosacharidy skládající se z 6-8 monomerních jednotek.[1,4]



Obr.19.: Odbourávání škrobu pomocí amylasy a fosforylasy

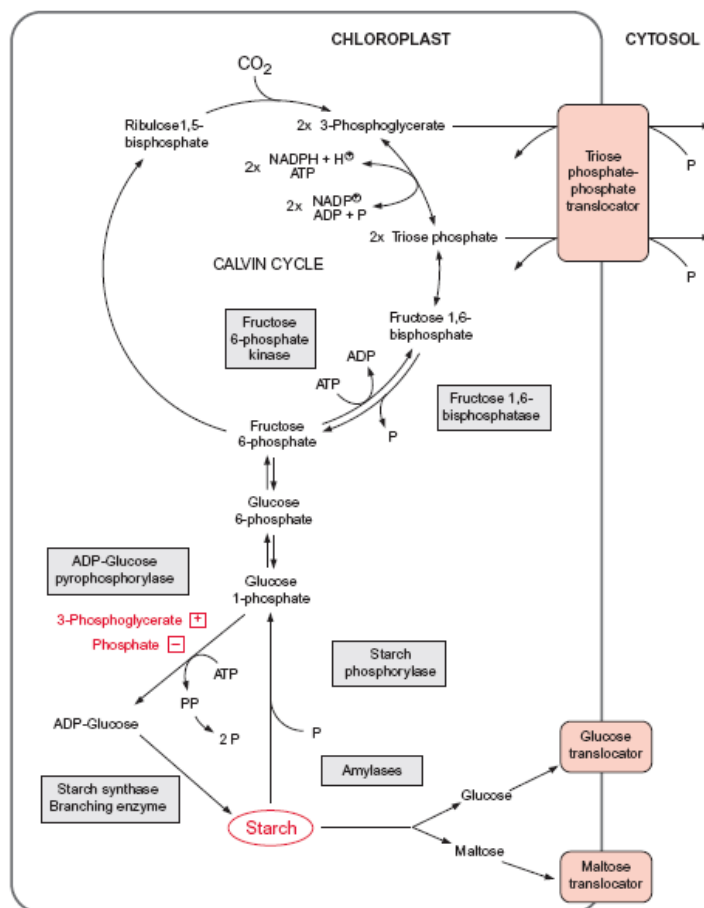
V rostlinných pletivech byla objevena α -glukan- H_2O dikinasa (EC 2.7.9.4.), kterou jsou glukosové jednotky molekul škrobu fosforylovány v pozici C6 pomocí ATP. Fosforylace je typickou dikinasovou reakcí, kterou se 3 substráty α -polyglukan, ATP a vody přeměňují na 3 produkty α -polyglukan-fosfát, AMP a fosfát. Škrob fosforylovaný na C6 je dále fosforylován α -glukan- H_2O kinasou na C3, k čemuž také dochází při syntéze škrobu.[1] α -glukan- H_2O dikinasa se účastní už syntézy škrobu a je nezbytná při jeho degradaci.[31]

1.3.3.3 Metabolismus asimilačního škrobu

Poměr koncentrací fosfátu a 3-PGA reguluje ADP-*Glucopyrofosforylasa*, která katalyzuje přeměnu sacharidů na škrob. 3-PGA je hlavním metabolitem ve stroma chloroplastů. Díky rovnovážnému stavu reakce katalyzované fosfoglycerátkinasou a reakce katalyzované glyceraldehydfosfátdehydrogenasou (EC 1.2.1.12), je koncentrace 3-PGA ve stroma mnohem vyšší než koncentrace triosafosfátu. Celkové množství fosfátu a fosforylovaných meziproductů Calvinova cyklu je ve stroma chloroplastu v podstatě konstantní díky protisměrné výměně triosafosfát-fosfátovým přenašečem. Koncentrace fosfátu poklesne pokud se koncentrace 3-PGA zvýší, z toho vyplývá že poměr koncentrací 3-PGA a fosfátu je dobrým ukazatelem stavu metabolismu. Když poklesne syntéza sacharosy, sníží se uvolňování fosfátu v cytosolu a chloroplasty mohou být vystaveny nedostatku fosfátu, což omezuje fotosyntézu v chloroplastech. Ačkoliv v takovýchto podmínkách stoupá koeficient 3-PGA a fosfátu, a to umožní syntézu škrobu a tím i uvolňování fosfátů dovolujících ve fotosyntéze pokračovat. V tomto případě má škrob funkci vyrovnávací látky a tudíž fotosyntéza není omezena. Asimiláty, které nejsou využity pro syntézu sacharosy, nebo dalších metabolitů jsou dočasně uloženy v chloroplastech jako asimilační škrob, kterého musí být dostatek pro nadcházející noc.[1]

Hydrolytické odbourávání škrobu vede k odštěpení maltosy a glukosy, které jsou transportovány do cytosolu specifickými translokátory. Maltosa je v cytosolu štěpena transglykosidasou (EC 2.4.1.24) na dvě molekuly glukosy. Jedna molekula glukosy je přenesena na α -glukan, který je odbouráván cytosolovou fosforylasou. Z druhé molekuly glukosy vzniká glukosa-6-fosfát díky fosforylaci hexokinasy (EC 2.7.1.1). glukosa-6-fosfát společně s glukosou-1-fosfát, která vzniká fosforolytickým štěpením škrobu, se přeměňují hexosafosfatisomerasou na fruktosa-6-fosfát. Jedná se o opačnou dráhu syntézy škrobu. Enzym fruktosa-6-fosfátkinasa (EC 2.7.1.11) přemění fruktosa-6-fosfát, která je součástí Calvinova cyklu, a jednu molekuly ATP za vzniku fruktosa-1,6-bisfosfát. Z jedné molekuly

fruktosa-1,6-bisfosfát pomocí enzymu aldolasy (EC 4.2.1.13) vznikají dvě molekuly triosafosfátu, které jsou buď přeneseny z chloroplastu přes triosafosfát-fosfátový translokátor do cytosolu, nebo jsou v chloroplastu oxidovány na 3-fosfoglycerát, který je následně přes stejný translokátor přenesen do cytosolu. Tento translokátor a translokátor glukosy se tak účastní mobilizace chloroplastového asimilačního škrobu.[1]



Obr.20.: Syntéza asimilačního škrobu [1]

2 Cíl práce

- 1) Shromáždit informace o metabolismu škrobu v rostlinách.
- 2) Zjistit, zda a v jakých podmínkách štěpí extrakt z listů tabáku škrob.

3 Materiál a metody

3.1 Rostlinný materiál

Nicotiana tabacum L. cv. Petit Havana, SR1, poskytnuty doc. RNDr. Helenou Ryšlavou CSc.

3.2 Chemikálie

Nerozpustný škrobový substrát – AMS 50 – Lachema, ČR

Na₂HPO₄ - Penta, ČR

NaH₂PO₄ - Penta, ČR

Kyselina citrónová - Lachema, ČR

Kyselina boritá - Lachema, ČR

Polyvinylpyrrolidon - Sigma, USA

3.3 Pufry

Citrátfosfátový pufr - pH 3,0 – 8,3

Borátový pufr - pH 7,6 – 9,2

Fosforečnanový pufr - pH 7,0 – 8,0

Pufr A - pH 7,8 (složení 1mM DTT, 1mM EDTA a 5 mM Mg²⁺)

3.4 Přístroje

Inkubátor se suchou lázní Ellite - Schoeller instruments, Velká Británie

Analytické váhy 100A - Denver Instrument Company, USA

pH metr UB - 10 - Denver Instrument Company, USA

Centrifuga Universal 32 R - Hettich, Německo

Spektrofotometr Ultrospec 2100 - Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie

3.5 Příprava enzymu

Na analytických vahách jsem navážila potřebné množství listu tabáku – cca 1,0-3,0 g. Danou navážku jsem rozetřela ve třecí misce a přidala jsem dvojnásobné množství navážky listu tabáku pufru A v ml. Poté jsem přidala malé množství PVP, které je schopné vasat fenolické látky.

Homogenát jsem převedla do plastových mikrokumavek a centrifugovala 15 minut při 3000 x g při 4 °C. Získaný supernatant jsem používala jako roztok enzymu.

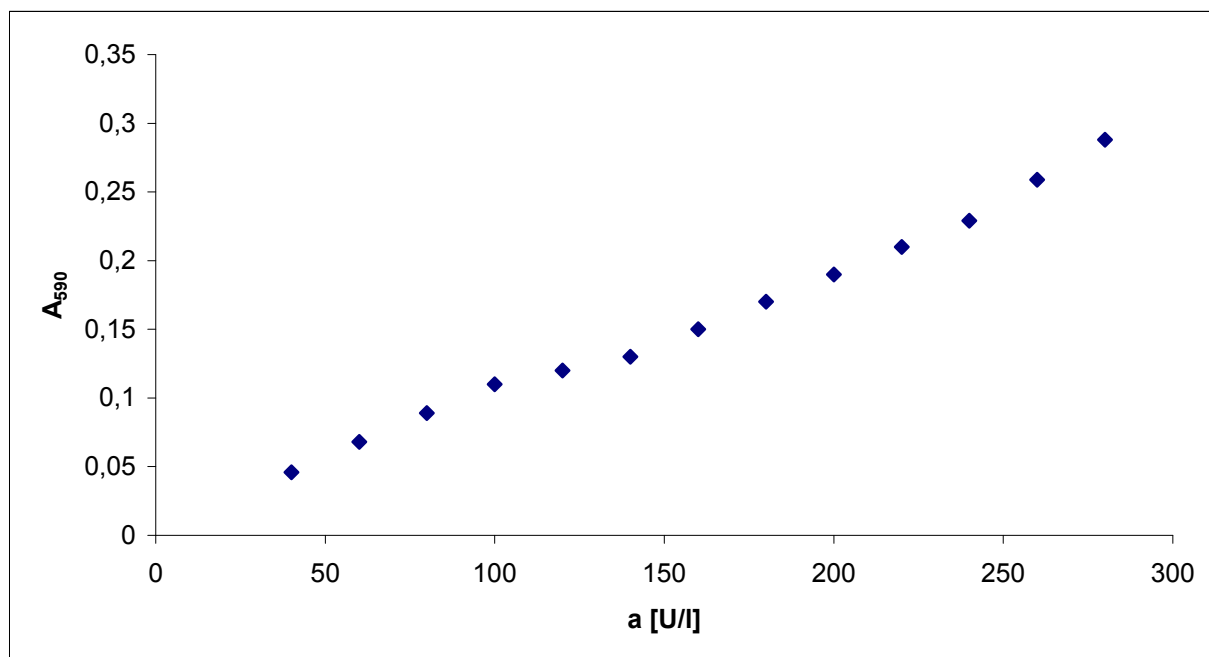
3.5.1 Stanovení enzymové aktivity

Enzymy α -amylasa a fosforylasa katalyzují hydrolýzu α -(1→4)-D-glukosidové vazby škrobu za vzniku maltosy. K tomuto stanovení byl použit nerozpustný modrý škrobový substrát, jehož hydrolýzou vzniká modré ve vodě rozpustné barvivo. Škrobový substrát byl připraven rozpuštěním 0,15 g v 5 ml destilované vody. Množství uvolněného barviva je přímo úměrné aktivitě enzymu.

Nejprve jsem pipetovala 0,3 ml škrobového substrátu a 0,5 ml citrátfosfátových pufrů o pH 5,8 – 8,3. Vzorky byly termostatovány po dobu 5 minut při teplotách 22 °C, 37 °C, 45 °C a 60 °C.

Poté jsem do každé mikrokumavky s reakční směsí pipetovala 0,2 ml roztoku enzymu. Reakci jsem nechala probíhat 15 minut a po skončení jsem přidala 1 ml srážecího roztoku. Po 15 minutách jsem vzorky centrifugovala 15 min při 3 000 x g při 4 °C.

Poté jsem spektrofotometricky změřila absorbanci při vlnové délce 590 nm. Vzorky byly měřeny vzhledem ke slepému pokusu, který místo roztoku enzymu obsahoval destilovanou vodu. Do výsledků jsem pomocí tabulky poskytované výrobcem škrobového substrátu převedla absorbanci na aktivitu enzymu (obr.21.)



Obr. 21.: Závislost absorbance na aktivitě enzymu

3.5.1.1 Stanovení enzymové aktivity v závislosti na teplotě

Rychlost enzymové reakce závisí na teplotě, při které probíhá. S rostoucí teplotou roste i aktivita enzymů. Pro zjištění teplotního optima jsem v termostátované lázni inkubovala vzorky při teplotách 25 - 60 °C. Reakční směs obsahovala 0,1 M fosforečnanového pufru, 0,3 ml škrobového substrátu a 0,2 ml roztoku enzymu.

Reakce byla ukončena po 15 minutách přidáním 1 ml srážecího roztoku - 0,02 M kyselina sulfosalicylová v 1,85 M $MgSO_4$ s 1,3 mM chelatonem 3. Po dalších 15 minutách jsem vzorky centrifugovala 5 min při 3 000 x g při 4 °C. Následně jsem spektrofotometricky změřila absorbanci při vlnové délce 590 nm. Vzorky byly měřeny vzhledem ke slepému pokusu, který místo roztoku enzymu obsahoval destilovanou vodu.

3.5.1.2 Stanovení množství produktu v závislosti na čase

Při měření závislosti množství produktu na čase jsem do reakční směsi (0,3 ml škrobového substrátu a 0,5 ml pufru – 0,1 M fosforečnanový o pH 7,4, 0,1 M borátový o pH 8,0, a 0,2 M citrátfosfátový o pH 7,4 a 8,0) přidala roztok enzymu a nechala termostátovat po dobu 15, 30, 45 a 60 minut. Po těchto časových intervalech byla reakce vždy ukončena přidáním 1 ml srážecího roztoku.

Po 15 minutách jsem vzorky centrifugovala 5 min při 3 000 x g při 4 °C. Poté jsem spektrofotometricky změřila absorbanci při vlnové délce 590 nm. Vzorky byly měřeny vzhledem ke slepému pokusu, který místo roztoku enzymu obsahoval destilovanou vodu. Do grafu jsem vynesla závislost množství produktu na čase.

3.5.1.3 Stanovení enzymové aktivity v závislosti na pH

Pro zjištění pH optima jsem použila tři různé pufrů - citrátfosfátový o pH 5,8 – 8,3, fosforečnanový o pH 7,0 - 8,0 a borátový o pH 7,6 – 9,0. Jelikož na hydrolýze škrobu se podílejí dva enzymy – α -amylasa a fosforylasy, zjišťovala jsem proto i dvě různá pH optima. Reakční směs obsahovala 0,5 ml pufru a 0,3 ml škrobového substrátu a nechala jsem ji termostatovat při teplotě 37 °C. Po 5 minutách jsem do plastových mikrozkušavek s reakční směsí přidala 0,2 ml roztoku enzymu a nechala v termostatované lázni 15 minut, kdy jsem reakci ukončila 1 ml srážecího roztoku. Po 15 minutách jsem vzorky centrifugovala 5 min při 3 000 x g při 4 °C. Poté jsem spektrofotometricky změřila absorbanci při vlnové délce 590 nm. Vzorky byly měřeny vzhledem ke slepému pokusu, který místo roztoku enzymu obsahoval destilovanou vodu. Do výsledků jsem absorbanci převedla na aktivitu enzymu (obr.21.).

3.5.1.4 Stanovení enzymové aktivity v závislosti na druhu pufru

Důležitou roli v aktivitě enzymu hraje použitý pufr a pH. To jsem zjišťovala za použití dvou rozdílných pufrů při stejném pH.

Nejprve jsem sledovala rozdíl aktivit α -amylasy a fosforylasy při pH 7,4, kdy do jedné reakční směsi jsem pipetovala 0,2 M citrátfosfátového pufru a do druhé 0,1 M fosforečnanového pufru. Fosforečnanový pufr jsem zvolila z důvodu ovlivnění aktivity enzymu v přítomnosti fosforečnanu. Aktivitu α -amylasy jsem zjišťovala při pH 8,0 u 0,2 M citrátfosfátovém pufru a 0,1 M borátového pufru. Borátový pufr jsem použila z důvodu nepřítomnosti fosforečnanu.

Reakční směs obsahovala 0,3 ml nerozpustného škrobového substrátu a 0,5 ml pufru a nechala jsem ji termostatovat při teplotě 37 °C. Po 5 minutách jsem přidala k reakční směsi 0,2 ml roztoku enzymu a nechala v termostatované lázni po dobu 15 minut, kdy jsem reakci ukončila přidáním 1 ml srážecího roztoku. Po 15 minutách jsem vzorky centrifugovala 5 min

při 3 000 x g při 4 °C. Následně jsem spektrofotometricky změřila absorbanci při vlnové délce 590 nm. Vzorky byly měřeny vzhledem ke slepému pokusu, který místo roztoku enzymu obsahoval destilovanou vodu. Do výsledků jsem absorbanci převedla na aktivitu enzymu (obr.21.)

4 Výsledky

V rámci předložené bakalářské práce jsem zjišťovala optimální podmínky pro štěpení škrobu α -amylasou a fosforylasou. Sledovala jsem vliv teploty, pH a složení pufru na rychlost enzymové reakce. V důsledku štěpení vazby v molekule

Jako substrát jsem využívala barevný škrob, po štěpení glykosidové vazby je uvolněno modré barvivo, které lze kvantifikovat měřením absorbance.

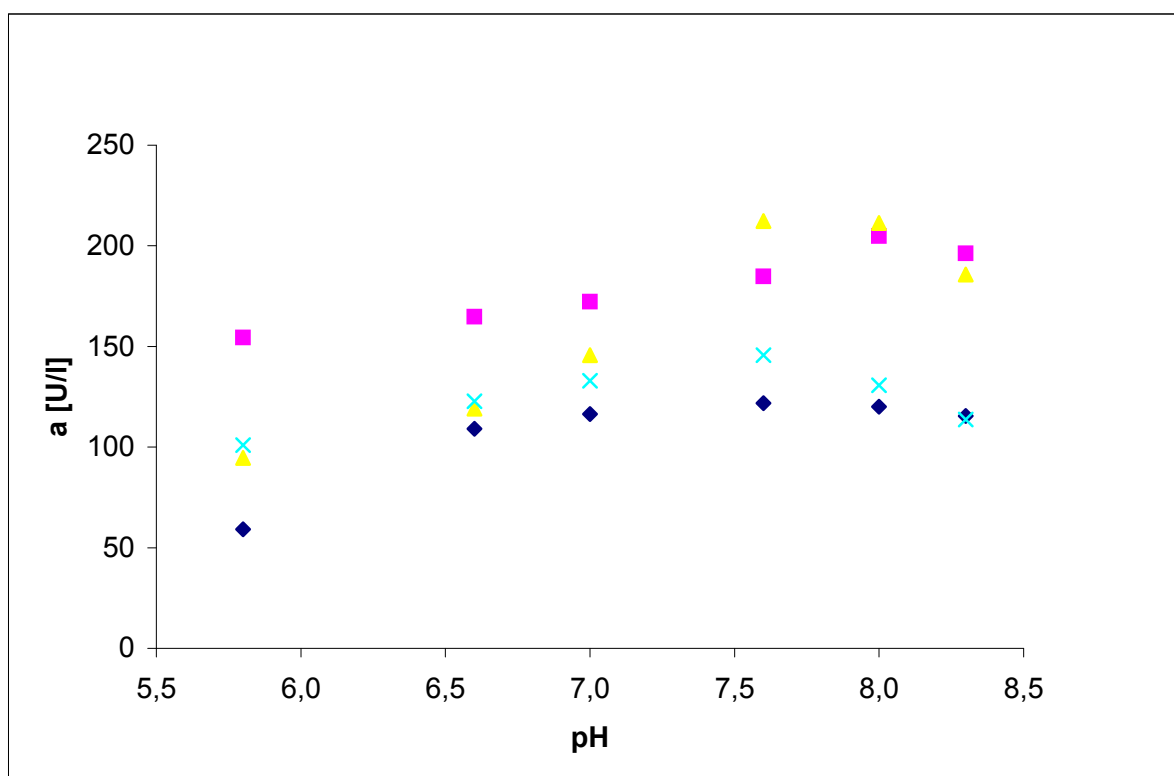
4.1 Závislost aktivity α -amylasy a fosforylasy na pH

4.1.1 Vliv pH na štěpení škrobu v citrátfosfátových pufrech

Měřila jsem vliv pH na aktivitu α -amylasy a fosforylasy v citrátfosfátových pufrech o pH 5,5 – 8,3. Postupovala jsem podle pracovního postupu uvedeném v kapitole 3.5.1.3.

Na Obr.22 je vidět, že enzymová aktivita při teplotách 22 °C, 45 °C a 60 °C postupně roste až k pH 7,6, kde dosahuje svého maxima a následně opět klesá. U teploty 37 °C je enzymová aktivita nejvyšší při pH 8,0, a poté opět začne klesat.

Po srovnání jednotlivých hodnot pH při rozdílných teplotách je vidět, že aktivita enzymů s rostoucí teplotou roste do určité teploty – teplotní optimum. Při vyšší teplotě dojde k denuraci enzymu a jeho aktivita klesne. Na obr.22 jsou hodnoty aktivity u teploty 60 °C nižší než u teploty 45 °C. Z toho vyplývá, že mezi hodnotou 45 °C a 60 °C se nachází teplotní optimum.



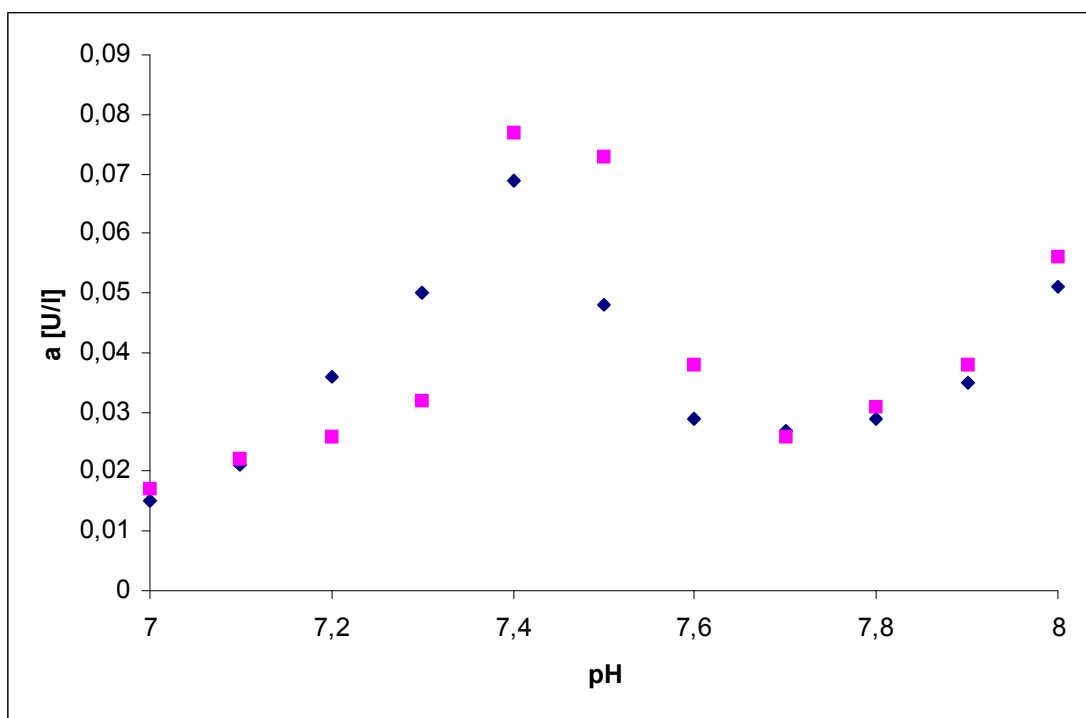
Obr. č.:22 Aktivita α -amylasy a fosforylasy v citrátfosfátovém pufru v závislosti na pH pufru a teplotě. Modré body představují teplotu 22 °C, růžové teplotu 37 °C, žluté teplotu 45 °C a světle modré křížky teplotu 60 °C.

4.1.2 Vliv pH na štěpení škrobu ve fosforečnanových pufrch

Závislost aktivity α -amylasy a fosforylasy na pH byla studována podrobněji mezi pH 7,0 a 8,0. Postupovala jsem podle pracovního postupu uvedeném v kapitole 3.5.1.3. Aktivita enzymů byla zjišťována při dvou různých teplotách : 37 °C a 45 °C.

Z níže uvedeného Obr.23. vyplývá, že aktivita α -amylasy a fosforylasy postupně narůstá až k hodnotě 7,4, kde dosahuje svého maxima, a poté opět začne klesat. Aktivita se od pH 7,8 opět zvyšuje k dalšímu vrcholu při pH 8,0.

Při srovnání teplot u pH optima je patrná vyšší aktivita enzymu opět u vyšší teploty.

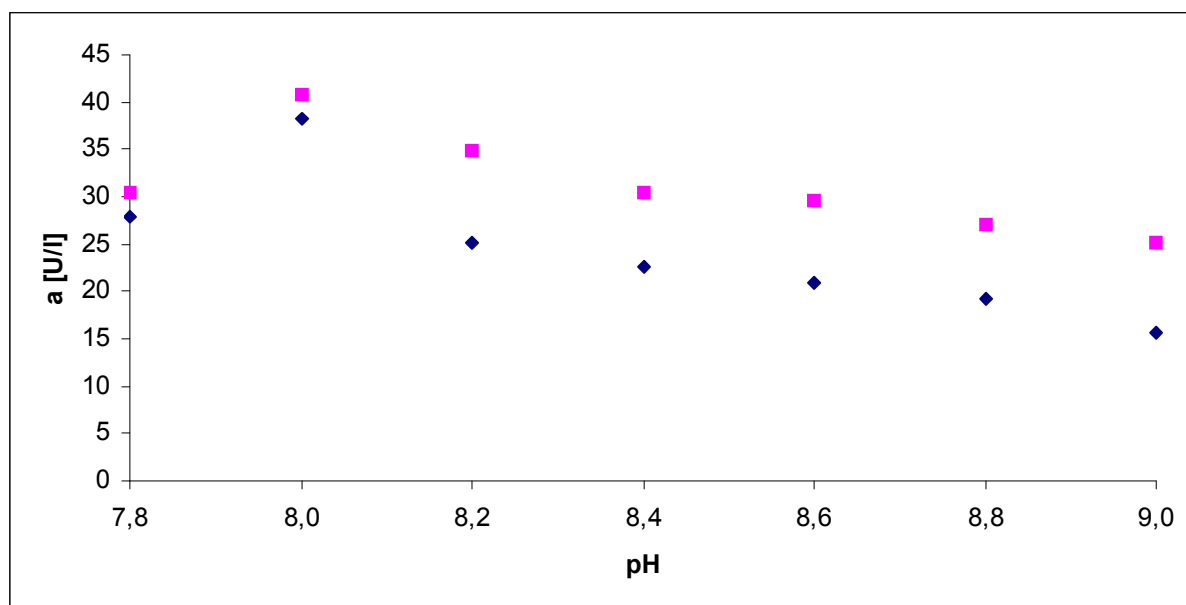


Obr.č.23 : Aktivita α -amylasy a fosforylasy ve fosforečnanovém pufru v závislosti na pH pufru a teplotě. Modré body jsou pro teplotu 37 °C a růžové pro teplotu 45 °C.

4.1.3 Vliv pH na štěpení škrobu v borátových pufrch

Z předchozího experimentu bylo patrné, že aktivita enzymů od hodnoty pH 7,7 začala opět růst. Jelikož fosforečnanový pufr má maximální hodnotu pH 8,0, byl dále použit borátový pufr v rozmezí pH 7,8 až 9,0. Další důvod použití borátového pufru je, že neobsahuje fosfát, a proto lze měřit aktivitu pouze α -amylasy. Postupovala jsem podle pracovního postupu uvedeném v kapitole 3.5.1.3.

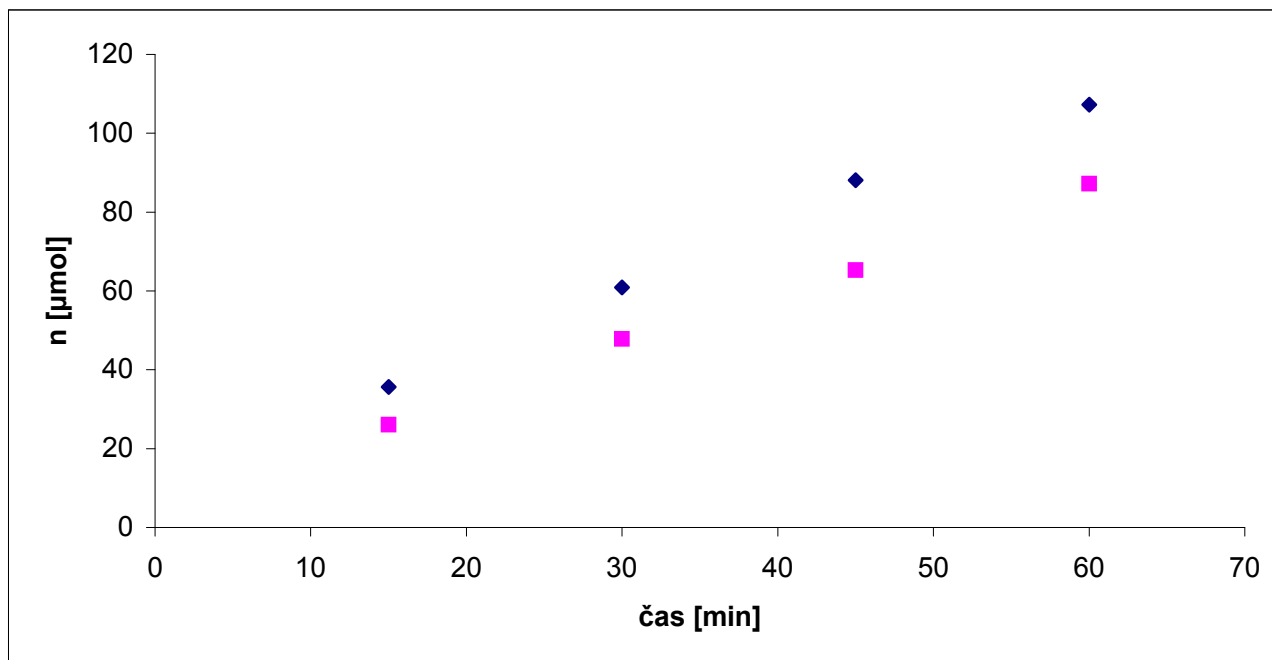
Aktivita enzymů byla porovnávána při dvou různých teplotách: 37°C a 45 °C. Následující obrázek č.24 ukazuje, že pH optimum pro α -amylasu je 8,0, a to opět při obou teplotách. Při srovnání teplot u pH optima je patrná vyšší aktivita enzymu opět u vyšší teploty.



Obr.č.24 : Aktivita α -amylasy v borátovém pufru v závislosti na pH pufru a teplotě. Modré body jsou pro teplotu 37 °C a růžové pro teplotu 45 °C.

4.2 Závislost štěpení škrobu na čase

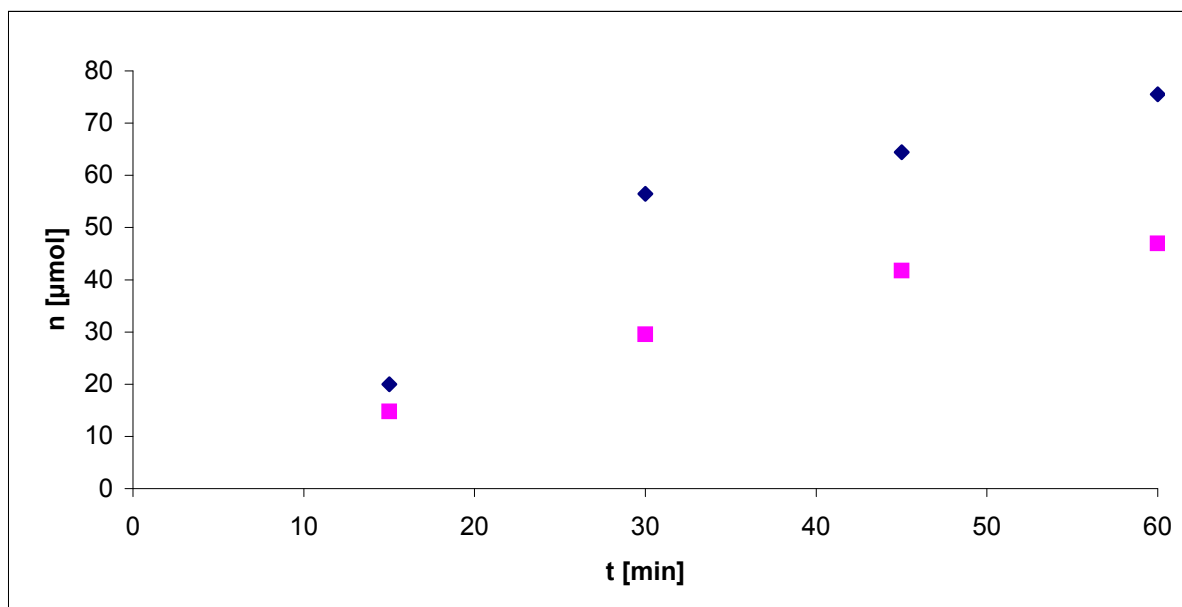
Štěpení škrobu α -amylasou a fosforylasou měřené při pH optimu fosforylasy dokumentuje obr.25. Štěpení probíhalo rychleji ve fosforečnanovém pufru než v citrátfosfátovém pufru.



Obr.č.25 : Závislost množství produktu reakce katalyzované α -amylasou a fosforylasou ve fosforečnanovém a citrátfosfátovém pufru při pH optimu 7,4 v závislosti na čase po 15 minutových intervalech. Modré body jsou pro fosforečnanový pufr a růžové pro citrátfosfátový pufr.

Časovou závislost hydrolyzy škrobu jsem sledovala také při pH optimu α -amylasy, pH 8,0 v borátovém a citrátfosfátovém pufru. Postupovala jsem podle pracovního postupu uvedeném v kapitole 3.5.1.2.

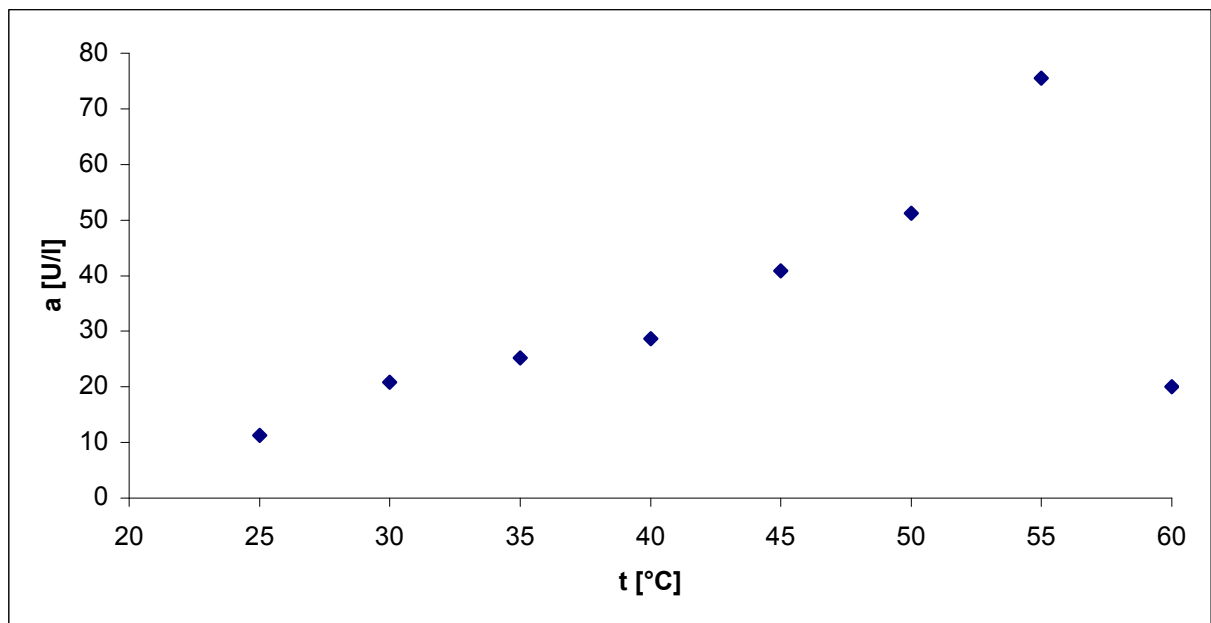
Obr.26 ukazuje postupný růst množství produktu v závislosti na délce enzymové reakce. Při srovnání množství vzniklého produktu mezi borátovým a citrátfosfátovým pufrům je patrné, že aktivita enzymů je větší v případě borátového pufru.



Obr.č.26: Závislost množství produktu reakce katalyzované α -amylasou v borátovém a citrátfosfátovém pufru při pH optimum 8,0 v závislosti na čase po 15 minutových intervalech. Modré body jsou pro borátový pufr a růžové pro citrátfosfátový pufr.

4.3 Vliv teploty na štěpení škrobu

Měřila jsem vliv teploty na aktivitu α -amylasy a fosforylasy ve fosforečnanovém pufru při pH 7,4. Postupovala jsem podle pracovního postupu uvedeném v kapitole 3.5.1.1. Obr.27 ukazuje průběh aktivity v závislosti na teplotě. Aktivita α -amylasy a fosforylasy průběžně roste až do teploty 55 °C a následně prudce klesne v důsledku pravděpodobné denaturace enzymu.



Obr. č.27. :Závislost aktivity enzymu α -amylasy a fosforylasy při pH 7,4 ve fosforečnanovém pufru na teplotě.

5 Diskuse

Škrob se ukládá jednak v plastidech zásobních orgánů rostlin, jednak v chloroplastech fotosyntetických pletiv. Tento škrob je syntetizován ve dne, kdy probíhá fotosyntéza, a štěpen v noci, kdy zajišťuje energii a metabolity.

Škrob je štěpen dvěma způsoby. Hydrolytické štěpení je katalyzováno α -amylasami, fosforolytické štěpení fosforylasami.

Výsledky uvedené v této bakalářské práci dokumentují, že v extraktu z listů tabáku jsou přítomny enzymy, které štěpí škrob hydrolyticky i fosforolyticky. pH optimum α -amylasy je v alkalické oblasti, pH 8,0. Toto pH optimum je výrazně vyšší než pH optimum lidské α -amylasy, jejíž hodnota je pH 6,7. pH optimum fosforolytického štěpení bylo nalezeno při pH 7,4, tedy v přibližně fyziologickém pH v buňce.

6 Závěr

1. Byl připraven extrakt z listů tabáku, který štěpil škrob hydrolyticky i fosforoliticky.
2. pH optimum fosforylasy bylo 7,4, pH optimum amylasy 8,0
3. Rychlost štěpení škrobu byla nejvyšší při teplotě 55 °C.

7 Literatura

- [1] Heldt, H.-W., Piechulla, B., Heldt, F.: 4. vydání, Plant Biochemistry, Academic Press, USA (2011)
- [2] Velíšek, J.: Chemie potravin, 2. vydání, Tábor (2002)
- [3] Fettke, J., Hejazi, M., Smirnova, J., Höchel, E.: Stage, M., Steup, M.: J. Exp. Bot. 60, 2907–2922, (2009)
- [4] Vodrážka, Z.: Biochemie, 2. vydání, Academia Praha, Praha (1996)
- [5] Jensen, A. B., Webb, C.: Process Biochemistry, 30, 225 – 236 (1994)
- [6] Appia-Ayme, C., Quatrini, R., Denis, Y.: BMC Genomics 10, 394 (2009)
- [7] Klouda, P.: Základy biochemie, 1.vydání, Nakladatelství Pavel Klouda, (2005)
- [8] Sherson, S., Alford, H., Forbes, S., Wallace, G., Smith, S.: J. Exp. Bot. 54, 525–531 (2003)
- [9] Biochemie základní kurz: kolektiv autorů, Praha (2009)
- [10] Stoop, J. M. H., Williamson, J. D., Pharr, D. M.: Trends Plant Sci. 1, 139-144 (1996)
- [11] Smirnoff, N., Cumbes, Q. J.: PhytoChem. 28, 1057-1060 (1989)
- [12] Gao, Z., Loescher, W. H.: Plant Physiol. 124, 321-330 (2000)
- [13] Moing, A., Carbonne, F., Rashad, M. H., Gaudillère, J. P.: Plant Physiol. 100, 1878-1884 (1992)
- [14] Williamson, J. D., Jennings, D. B., Guo Wein-Wen, Pharr D. M.: J. Am. Soc. Hortic. Sci. 127, 467-473 (2002)
- [15] Badal, C.: J. Ind. Microbiol. Biot. 30, 279-291 (2003)
- [16] Geigenberger, P.: Plant Physiol. 155, 1566-1577 (2011)
- [17] Jane, J.: Structural Features of Starch Granules II, 3. vydání, Londýn (2009)
- [18] Ritte, G., Lloyd, J., Eckermann, N., Rottmann A, Kossmann, J., Steup, M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 7166–7171 (2002)
- [19] Kolektiv: Biochemie, skriptum MU Brno (2005)
- [20] Polysacharidy a oligosacharidy [on line]. [cit. 2010-15-1]
- [21] Lauro, M., Forsell, P. M., Sourtti, M. T., Hulleman, S. H. D., Poutanen, K. S.: Cereal Chem. 79, 925–930 (1999)
- [22] Šícho, V.: Potravinářská biochemie, SNTL – Nakladatelství technické literatury,(1984)
- [23] Van der Maarel, M. J. E. C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H.,

- Dijkhuizen, L.: *J. Biotechnol.* 94, 137-155 (2002)
- [24] Dinges J. R., Colleoni Ch., Myers A. M., James M. G.: *Plant Physiol.* 125, 1406-1418
- [25] Tsai, H-L., Lue W-L., Lu K-J., Hsieh M-H., Wang S-M.: *Plant Physiol.* 151, 1582-1595 (2009)
- [26] Baroja-Fernandez, E., Munoz, F. J., Saikusa, T.: *Plant Cell Physiol.* 44 500–509 (2003)
- [27] Fritzius, T., Aeschbacher, R., Wiemken, A., Wingler, A.: *Plant Physiol.* 126, 883–889 (2001)
- [28] Copeland, L., Preiss, J.: *Plant Physiol.* 68, 996–1001 (1981)
- [29] Newgard, C. B., Hwang, P. K., Fletterick, R. J.: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 24, 69–99 (1989)
- [30] Beck, E., Ziegler, P.: *Plant Physiol.* 40, 95–117 (1989)
- [31] Ritte, G., Steup, M., Kossmann, J., Lloyd, J.: *Plant Physiol.* 216, 798-801 (2001)
- [32] Ryšlavá, H., Doubnerová, V.: *Biochemie rostlin, Úvodní hodina a kompartmenty* (2011)

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.“

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
-------------------------------	----------	-----------------	----------