

Dátum:
16.3.2007

Časový priebeh štiepenia želatíny trypsínom

Anton Repko
BCHPV/2

Úvod

Enzým trypsín (EC 3.4.21.4) hydrolyticky štiepi niektoré peptidové väzby v bielkovinách. V tejto úlohe som skúmal množstvo rozštiepených peptidových väzieb v želatíne v závislosti na čase pri 37 °C. Na zastavenie reakcie som pridal roztok formaldehydu, čím sa inaktivoval enzým a zároveň sa zamaskovali aminoskupiny, čo umožnilo stanoviť uvoľnené karboxylové skupiny titráciou 0,1 M roztokom hydroxidu sodného. Následne som spotrebované množstvá NaOH vyniesol do grafu a zo smernice v bode $t = 0$ určil počiatočnú rýchlosť reakcie.

Aparatúra

automatická byreta s 0,1 M NaOH, neutrálny 40% roztok formaldehydu, 0,5% alkoholický roztok fenolftaleínu, 11 Erlenmayerových baniek po 100 ml, 50 ml kadička, 50 ml odmerný valec, 10 ml pipeta, automatická pipeta na 10-1000 l so špičkou, termostat, stopky

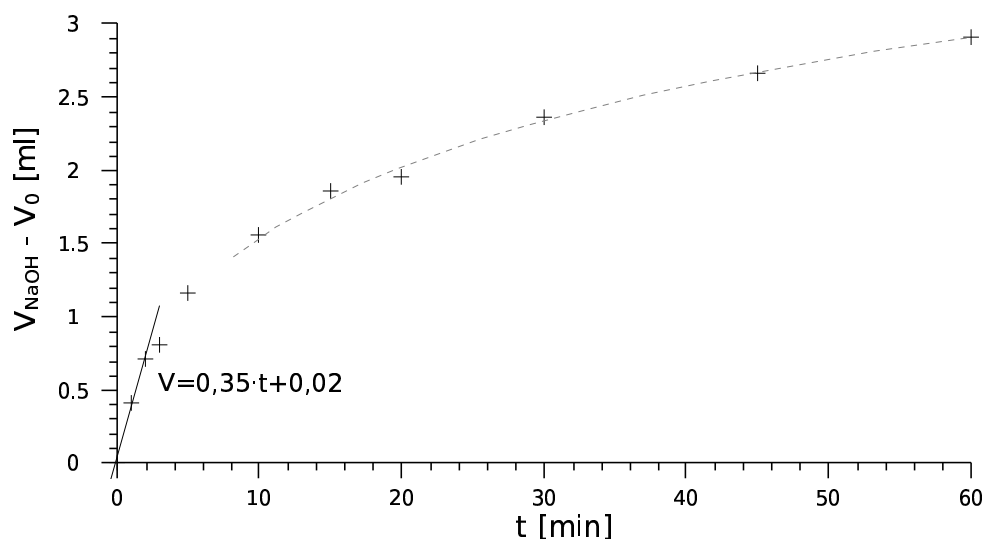
Postup

Do malej kadičky som navážil 0,200 g trypsínu, pridal 10,0 ml vody a pomaly miešal do rozpustenia. Do Erlenmayerových baniek som odmeral po 25 ml 5% roztoku želatíny, odpipetoval po 1,5 ml roztoku fenolftaleínu a zneutralizoval do slabo ružového sfarbenia 0,1 M roztokom NaOH. Priemerne bolo na toto potrebných 2,70 ml hydroxidu. Banky a kadičku s enzýmom som vložil do termostatu na 37 °C. Potom som do baniek so želatínou pridával po 0,5 ml roztoku trypsínu a reakciu som po rôzne dlhých časových intervaloch zastavil prídavkom 5 ml roztoku formaldehydu. Výsledné zmesi som titroval do slabo ružového zafarbenia.

Výsledky

t [min]	0	1	2	3	5	10	15	20	30	45	60
V_{NaOH} [ml]	3,20	3,60	3,90	4,00	4,35	4,75	5,05	5,15	5,55	5,85	6,10
$V_{\text{NaOH}} - V_0$ [ml]	0,00	0,40	0,70	0,80	1,15	1,55	1,85	1,95	2,35	2,65	2,90

Množstvo spotrebovaného NaOH v závislosti na čase



Nameraná aktivita 1 g trypsínu v 4,2% želatíne (po zarátaní pridaných roztokov):

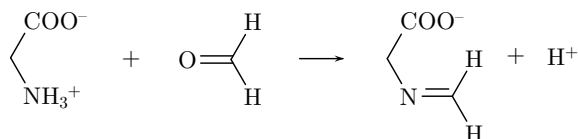
$$v = \frac{dV_{\text{NaOH}}}{dt} \cdot \frac{c_{\text{NaOH}}}{m_{\text{trypsín}}} = 0,35 \cdot \frac{0,1}{0,01} = 3,5 \text{ mol.s}^{-1}\text{g}^{-1}$$

Záver

Množstvo štiepiteľných peptidových väzieb ubúda pomerne rýchlo, čo sa prejavilo spomaľením rýchlosti reakcie pri dlhších časoch, kedy už enzým má menšie množstvo substrátu. Na presnejšie vyhodnotenie počiatočnej rýchlosti reakcie by bolo treba vykonať experiment s nižšími koncentráciami enzýmu, prípadne väčším množstvom želatíny.

Odpovede na kontrolné otázky

1. Želatína je čiastočne hydrolyzovaný kolagén z kostí a kože prežúvavcov, ošípaných a hydiny.
2. Reakcia glycínu s formaldehydom:



3. Pred začatím reakcie sa titruje hydroxidom sodným, aby bolo dosiahnuté alkalické prostredie, ktoré je optimálne pre činnosť trypsínu.