

**UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO -TECHNOLOGICKÁ**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**2012**

**Bc. Hana Víšková**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Uplatnění mikrokalorimetrie při studiu enzymatických reakcí

Bc. Hana Víšková

Diplomová práce  
2012

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné použití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Pardubice je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a souhlasím s prezenčním zpřístupněním mé práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 2. května 2012

.....

Hana Víšková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé práce Ing. Pavle Honcové, Ph.D. za věnovaný čas, cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat konzultantce Ing. Veronice Podzemné, Ph.D. za snahu, laskavost a poskytnutí informací o metodice a zkušenostech. Dále bych ráda poděkovala paní Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za ochotu a odbornou konzultaci problematiky.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu a trpělivost a hlavně mému dědečkovi za odbornou konzultaci s osobitým přístupem a za velký vzor po odborné i osobní stránce.

## **Uplatnění mikrokalorimetrie při studiu enzymatických reakcí**

### **Abstrakt**

Cílem této práce je studium kinetiky enzymatické reakce trypsinu a substrátu N $\alpha$ -bezoyl-L-arginin-p-nitroanilid hydrochloridu (BApNA) metodou mikrokalorimetrie a spektrofotometrie a nalezení takových podmínek experimentu, aby akceptovaly omezení použitých technik a vyhovovaly požadavkům na měření. Současně byla sledována kinetika reakce trypsinu a substrátu BApNA v závislosti na změně reakčních podmínek, jako byla změna teploty, koncentrace enzymu, koncentrace substrátu a poměru látkových množství enzymu a substrátu.

**Klíčová slova:** trypsin, BApNA, reakční kinetika, mikrokalorimetrie

## **The application of microcalorimetry in the study of enzymatic reactions**

### **Abstract**

The aim of this diploma work is the study of the kinetics of enzymatic reaction of trypsin and its substrate N $\alpha$ -bezoyl-L-arginine-p-nitroanilid hydrochloride (BApNA) using microcalorimeter and spectrophotometer and to discover such conditions of the experiment which would accept a limitation of used techniques and meet the requirements for the measurement. The kinetics of reaction of trypsin and its substrate BApNA was studied as well as its dependence on the reaction conditions like changes in temperature, enzyme concentration, substrate concentration and the ratio of the quantity of enzyme and substrate was also monitored.

**Keywords:** trypsin, BApNA, kinetics of reaction, microcalorimetry

# OBSAH

Seznam zkratk	8
Seznam obrázků	9
Seznam tabulek	11
Úvod	12
1 Teoretická část	13
1.1 Struktura a vlastnosti enzymů	13
1.1.1 Základní vlastnosti enzymů	13
1.1.2 Intracelulární a extracelulární enzymy	14
1.1.3 Mechanismus enzymaticky katalyzované reakce	14
1.1.4 Specifita enzymů	16
1.1.5 Absorpce viditelného a ultrafialového záření	17
1.2 Kinetika enzymatické reakce, rovnice Michaelise a Mentenové	17
1.2.1 Význam a interpretace Michaelisovy konstanty $K_m$	21
1.2.2 Komplikovanější reakční mechanismy	22
1.2.3 Aktivační energie	23
1.2.4 Teorie přechodného stavu	23
1.2.5 Katalytická aktivita enzymu	24
1.2.6 Analýza kinetických dat	24
1.2.7 Fotometrické metody stanovení katalytické aktivity enzymů, BioPhotometer plus	25
1.2.8 Požadavky na metodu vyšetřující aktivitu enzymů	26
1.3 Enzymy pankreatu, trypsin	27
1.3.1 Klasifikace trypsinu	29
1.3.2 Sekrece prekursoru trypsinu a jeho aktivace	30
1.3.3 Katalytický mechanismus trypsinu	31
1.3.4 Reakce trypsinu s $N\alpha$ -bezoyl-L-arginin-p-nitroanilid hydrochloridem (BApNA)	32
1.4 Mikrokolorimetrie	33
1.4.1 Reakční teplo, entalpie a biologické systémy	33
1.4.2 Využití mikrokolorimetru v biochemii a mikrobiologii	34
1.4.3 Výhody a nevýhody mikrokolorimetrie	36
1.4.4 IC-kolorimetry	36
1.4.5 Kalibrace mikrokolorimetru	39
1.4.6 Faktory ovlivňující citlivost čipu	40
2 Experimentální část	42
2.1 Použité chemikálie	42
2.2 Zařízení a příslušenství	43
2.3 Pracovní postupy	44
2.3.1 Elektrická kalibrace	44
2.3.2 Chemická kalibrace	44
2.3.3 Studium kinetiky reakcí pomocí mikrokolorimetru	44
2.3.4 Studium kinetiky reakcí pomocí BioPhotometru plus	46
2.4 Vyhodnocení výsledků	46
3 Výsledky a diskuze	48
3.1 Kalibrace kalorimetru	50
3.1.1 Elektrická kalibrace	50

3.1.2	Chemická kalibrace.....	51
3.2	Kinetika enzymatické reakce studovaná pomocí mikrokalorimetru.....	54
3.2.1	Výsledky posledních studií, zabývajících se reakcí trypsinu a substrátu BApNA .....	55
3.2.2	Poznatky z literatury zohledněné při vyhodnocování dat.....	56
3.2.3	Vliv teploty na rychlost enzymatické reakce .....	58
3.2.4	Vliv koncentrace enzymu na kinetiku enzymatické reakce.....	59
3.2.5	Vliv koncentrace substrátu na kinetiku enzymatické reakce .....	60
3.3	Kinetika enzymatické reakce studovaná spektrofotometricky pomocí BioPhotometru plus.....	64
4	Závěr .....	68
5	Literatura.....	70

## **PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK**

<b>Lys</b>	Lysin
<b>Asp</b>	Aspartát
<b>Arg</b>	Arginin
<b>Ser</b>	Serin
<b>Cys</b>	Cystein
<b>BApNA</b>	N $\alpha$ -bezoyl-L-arginin-p-nitroanilid hydrochloridem
<b>PSTI</b>	Pancreatic secretory trypsin inhibitor



## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Nekatalyzovaná reakce [4] .....	14
Obr. 2 Schematické znázornění energetického průběhu reakce bez katalyzátoru (červená) a s katalyzátorem (modrá křivka) [1].....	15
Obr. 3 Enzymaticky katalyzovaná reakce [4].....	15
Obr. 4 Komplex enzym-substrát [1] .....	16
Obr. 5 Reakční a substrátová specifita [4].....	17
Obr. 6 Závislost počáteční rychlosti $v_0$ reakce Michaelise a Mentenové na koncentraci substrátu [S] [8].....	20
Obr. 7 Závislost $1/V$ na $1/S$ podle Lineweavera a Burka [10].....	21
Obr. 8 Mechanismus uvolnění ethylalkoholu $P_1$ v průběhu enzymatické reakce [6]	22
Obr. 9 Reakční koordináta [12] .....	23
Obr. 10 Účinek katalyzátoru na diagram přechodového stavu reakce [8].....	24
Obr. 11 Vynesení podle Eysenthala a Cornish-Bowdena [11].....	25
Obr. 12 Schematické znázornění kyvety Hellma (TrayCell).....	26
Obr. 13 Katalytická triáda [1] .....	28
Obr. 14 Formování polyiontových komplexních micel[19] .....	29
Obr. 15 Katalytický mechanismus trypsinu a ostatních serinových proteáz [3] .....	31
Obr. 16 Mechanismus katalýzy trypsinu [6] .....	32
Obr. 17 Reakce trypsinu a $N\alpha$ -bezoyl-L-arginin-p-nitroanilid hydrochloridem.....	32
Obr. 18 Závislost rychlosti enzymatické reakce na koncentraci substrátu [35].....	35
Obr. 19 Kalorimetrické měření metabolické produkce tepla biofilmu Escherichia coli [36].....	35
Obr. 20 Schematické znázornění konstrukčně odlišných IC kalorimetrů [39].....	37
Obr. 21 Fotografie IC-kalorimetru [26] .....	38
Obr. 22 Schéma čipu s termočlánky a ohříváči [26].....	38
Obr. 23 Ukázka vyhodnocení plochy píku pro reakci HCl a tris(hydroxymethyl)-aminomethanu.....	46
Obr. 24 Ukázka vyhodnocení entalpie reakce a časové konstanty kalorimetru pro výpočet kinetických parametrů .....	47
Vložený obrázek je detail sestupné části křivky.....	47
Obr. 25 Ukázka vyhodnocení cyklů výstupního signálu závislosti $U=f(t)$ .....	50
Obr. 26 Ukázka vyhodnocení cyklů vstupního signálu závislosti $P=f(t)$ .....	51
Obr. 27 Ukázka průběhu výstupního signálu napětí při chemické kalibraci v závislosti na koncentraci kyseliny chlorovodíkové při konstantní koncentraci tris(hydroxymethyl)-aminomethanu .....	52
Obr. 28 Chemická kalibrace .....	52
Obr. 29 Ukázka průběhu výstupního signálu napětí při chemické kalibraci v závislosti na koncentraci hydroxidu sodného při konstantní koncentraci kyseliny chlorovodíkové .....	53
Obr. 30 Chemická kalibrace .....	54
Obr. 31 Závislost aktivity enzymu na jeho koncentraci[34].....	57
Obr. 32 Inhibice substrátem [9] .....	57
Obr. 33 Inhibice substrátem [9].....	58
Obr. 34 Vliv teploty na rychlost enzymatické reakce.....	59
Obr. 35 Vliv koncentrace enzymu na rychlost reakce trypsinu a substrátu BApNA	60

Obr. 36 Ukázka odezvy signálu pro nejnižší a nejvyšší použitou koncentraci substrátu a pro koncentraci substrátu, při které probíhá reakce nejrychleji.....	61
Obr. 37 Ukázka odezvy signálu pro nejnižší a nejvyšší použitou koncentraci substrátu .....	62
Obr. 38 Závislost rychlosti reakce na změně koncentrace substrátu .....	63
Obr. 39 Výstupní signál pro poměr $n_E:n_S \sim 1:36$ .....	63
Obr. 40 Kinetika enzymatické reakce sledovaná pomocí BioPhotometeru plus v různých objemech .....	65
Obr. 41 Kinetika enzymatické reakce sledovaná pomocí BioPhotometeru plus v různých objemech .....	66
Obr. 42 Kinetika enzymatické reakce sledovaná pomocí BioPhotometeru plus (červená křivka, ředěno do 50 $\mu$ l) a IC mikrokolorimetru (černá křivka) pro identické poměry $n_E:n_S \sim 1:44$ .....	67

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Hodnoty entalpií reakce $\Delta H_r$ tris(hydroxymethyl)aminomethanu s HCl pro různé teploty .....	40
Tab. 2 Seznam použitých chemikálií .....	42
Tab. 3 Výsledky měření elektrické kalibrace .....	50
Tab. 4 Výsledky vyhodnocení první chemické kalibrace čipu TA12.....	53
Tab. 5 Výsledky vyhodnocení druhé chemické kalibrace čipu TA12.....	54
Tab. 6 Výsledky studia vlivu změny pufru na entalpii reakce trypsinu a substrátu BApNA .....	56
Tab. 7 Publikované hodnoty entalpie pro různé pufrы a pH.....	56
Tab. 8 Výsledky studia vlivu změny pufru na kinetiku reakce trypsinu a substrátu BApNA .....	56
Tab. 9 Závislost teploty na rychlost enzymatické reakce .....	58
Tab. 10 Vliv koncentrace enzymu na rychlost reakce .....	59
Tab. 11 Vliv koncentrace enzymu na rychlost reakce .....	60
Tab. 12 Vliv koncentrace substrátu BApNA na rychlost jeho reakce s trypsinem ...	61
Tab. 13 Vliv koncentrace substrátu BApNA na rychlost jeho reakce s trypsinem ...	62

## ÚVOD

Tato diplomová práce byla zpracována v termodynamické laboratoři Katedry anorganické technologie Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice, která se řadu let věnuje studiu problematiky některých reakcí důležitých v klinické medicíně, např. studiu kinetiky růstu ledvinových kamenů *in vitro* pomocí kalorimetrických metod. Tato problematika byla sledována v rámci mezinárodní spolupráce s Univerzitou Palma Mallorca (Španělsko), s Katedrou fyzikální chemie TU Bergakademie Leoben (Rakousko) a zvláště pak Katedrou fyzikální chemie TU Bergakademie Freiberg (Německo). Spolupráce s pracovištěm ve Freibergu umožnila věnovat se později výzkumu kinetiky enzymatických reakcí, který byl zahájen po zakoupení mikrok calorimetru, vyvinutém na tomto pracovišti.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Struktura a vlastnosti enzymů

U živých systémů probíhá obrovské množství biochemických reakcí a téměř všechny z nich jsou zprostředkovány řadou biologických katalyzátorů známých jako enzymy [1].

Enzymy patří mezi globulární bílkoviny, jejich molekula se podobá micelle. Má polární obal tvořený z polárních postranních řetězců a nepolární nitro, kde se nachází páteř polypeptidového řetězce a nepolární postranní řetězce.

Enzymová reakce probíhá v oblasti enzymové molekuly zvané aktivní centrum. Jedná se o prostorově vymezenou malou oblast molekuly, obsahující určité, přesně rozmístěné funkční skupiny. Ty jsou součástí postranních řetězců aminokyselinových zbytků, které bývají vestavěny na různých, často vzdálených místech v polypeptidovém řetězci enzymu, jehož svinutím do osobité prostorové struktury se dostávají do bezprostřední blízkosti.

Existují 3 typy prostorového zformování aktivních center [2]:

- Puklina: Enzymy s tímto typem aktivního centra štěpí dobře přístupné vazby.
- Mělká povrchová prohlubeň: Vyskytuje se u trypsinu, chymotrypsinu a elastázy. Tyto enzymy štěpí vláknité bílkoviny (svalový myosin, kolageny, kreatiny), které mají kompaktní sekundární strukturu a uspořádání molekul do několikavláknových pásů a smyček. Tvar pukliny by vyžadoval rozpad těchto struktur. Tvar mělké prohlubně dovolí štěpit peptidové vazby přímo ve svazku řetězců, aniž by je enzym předem rozbaloval na jednotlivá vlákna.
- Jamka: Vyskytuje se u enzymů, odštěpujících koncové struktury substrátů.

Význam pro získání detailního obrazu molekulové stavby enzymů má rentgenostrukturní analýza krystalů enzymů. Umožní vytvoření prostorového modelu molekul na úrovni rozlišení jednotlivých atomů [2].

### 1.1.1 Základní vlastnosti enzymů

Ačkoli enzymy podléhají stejným přírodním zákonům jako ostatní katalyzátory, liší se od nich v několika aspektech [1]:

1. Rychlost enzymaticky katalyzované reakce bývá obvykle o 6-12 řádů vyšší než rychlost odpovídající reakce bez katalyzátoru a nejméně o několik řádů vyšší než rychlost příslušné reakce katalyzované chemicky.
2. Enzymaticky katalyzované reakce probíhají při relativně mírných podmínkách (při teplotě pod 100 °C, atmosférickém tlaku a téměř neutrálním pH). Naproti tomu účinná

chemická katalýza často vyžaduje zvýšené teploty a tlak stejně jako extrémní hodnoty pH.

3. Ve srovnání s chemickými katalyzátory mají enzymy mnohem vyšší stupeň specifity ke svým substrátům (reaktantům) a tvoří mnohem specifitější produkty než chemické katalyzátory; to znamená, že enzymatické reakce mají málokdy vedlejší produkty.
4. Významná je schopnost regulace enzymatických reakcí. Katalytická aktivita mnoha enzymů se liší v závislosti na koncentraci jiných látek než vlastních substrátů. Mechanismus tohoto procesu regulace zahrnuje alosterickou regulaci, kovalentní modifikace enzymů a variabilitu množství syntetizovaného enzymu.

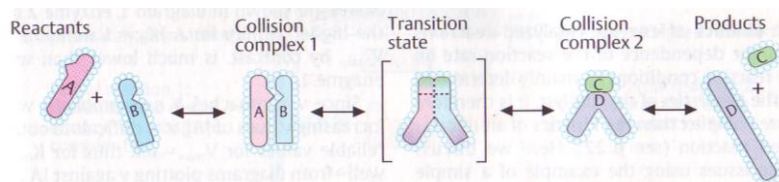
### 1.1.2 Intracelulární a extracelulární enzymy

Podle místa působení lze enzymy rozdělit na intracelulární a extracelulární. Extracelulární enzymy jsou buňkami, které je vyrobily, vylučovány a nacházíme je tedy v tkáňových kapalinách (trávicí šťávy, krev, mozkomíšni mok). Ve fixaci terciální a kvarterní struktury enzymů se uplatňují hlavně hydrofobní a elektrostatické interakce, případně disulfidové vazby. Intracelulární enzymy, kterých je většina, zůstávají uvnitř buňky, ve které vznikly, zabudovány do nadmolekulových struktur a vykonávají zde své specifické funkce. Molekuly těchto enzymů jsou dostatečně stabilizovány a nepotřebují proto zpevnění konformace pomocí kovalentních příčných vazeb jako enzymy extracelulární [2, 3].

### 1.1.3 Mechanismus enzymaticky katalyzované reakce

Mechanismus nekatalyzované reakce je znázorněn na obr. 1. Při reakci  $A+B \rightarrow C+D$  jsou reaktanty  $A$  a  $B$  v roztoku obklopeny vrstvou molekul vody a pohybují se náhodným směrem. Mohou reagovat pouze takové molekuly, které se dostanou do kontaktu. K tomu dochází jen ojedinelé.

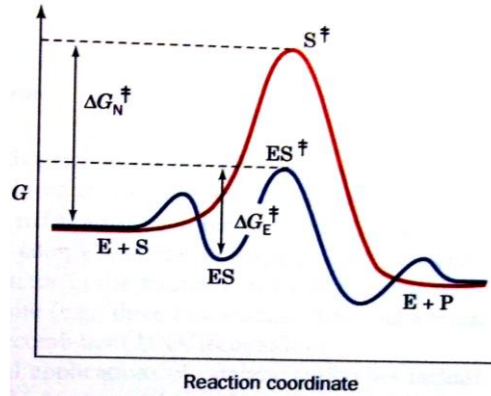
Před přeměnou na produkty  $C$  a  $D$  musí kolizní komplex  $A-B$  projít přechodným stavem, tedy uskupením, které obvykle potřebuje veliké množství aktivační energie pro proces přeskupení hydratační vrstvy mezi reaktanty  $A$  a  $B$ . Přechodný stav vzniká méně často než kolizní komplex. V důsledku těchto omezení nastává konverze (pokud je vůbec termodynamicky možná) v nepřítomnosti katalyzátoru pouze příležitostně a reakční rychlost  $v$  je malá [4].



**Obr. 1 Nekatalyzovaná reakce [4]**

Funkce katalyzátoru spočívá v tom, že výsledné přeměny reaktantů na produkty se dosahuje jiným, energeticky méně náročným mechanismem než u původní nekatalyzované

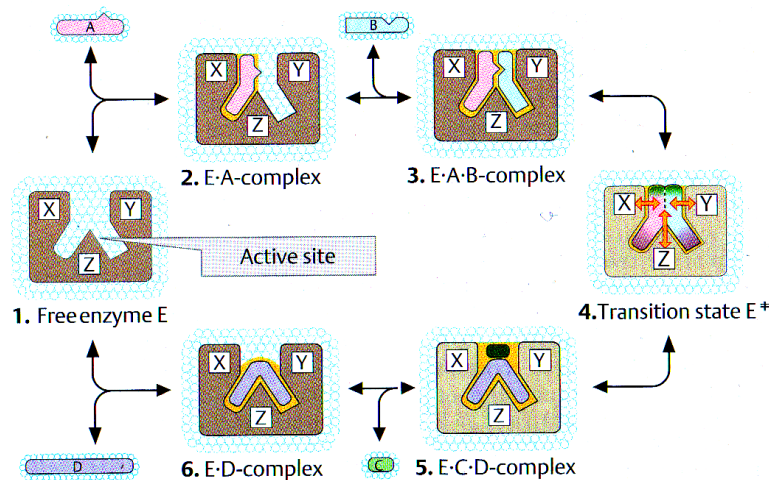
reakce [5]. Rychlost určující krok enzymaticky katalyzované reakce (krok nejpomalejší) má nižší aktivační energii než rychlost určující krok nekatalyzované reakce, přičemž všechny energie přechodných stavů v reakční cestě zprostředkované katalyzátorem jsou nižší než nejvyšší energie přechodného stavu reakce nekatalyzované (obr. 2) [6].



**Obr. 2 Schematické znázornění energetického průběhu reakce bez katalyzátoru (červená) a s katalyzátorem (modrá křivka), kde  $\Delta G_N^\ddagger$  je aktivační energie pro enzymaticky nekatalyzovanou reakci a  $\Delta G_E^\ddagger$  je aktivační energie pro enzymaticky katalyzovanou reakci [1]**

Katalyzátor neovlivňuje rovnováhu reakce, pouze přispívá k jejímu rychlejšímu dosažení.

Na obr. 3 je znázorněn postupný mechanismus reakce probíhající v aktivním centru enzymu. Nejdříve vzniká vazba mezi substráty A a B a následně vznikají produkty C a D. Vhodnou orientací substrátů a díky jich přiblížení roste pravděpodobnost vzniku E–A–B komplexu i přechodného stavu (kroky 1-3 na obr. 3). Vytvořením vazby mezi substrátem a aktivním centrem enzymu (nekovalentní vazba) dochází k odstranění hydratačních vrstev (jedna nebo několik přesně umístěných molekul vody se však může účastnit vazby mezi substrátem a enzymem). V důsledku vyloučení vody se vytvoří specifické „mikroprostředí“, jehož fyzikální vlastnosti jsou odlišné od vlastností vodného media (krok 3-5 na obr. 3). Přechodný stav je stabilizován interakcemi mezi katalytickými skupinami enzymu a substrátem, to znamená, že elektrostatické interakce a vodíkové vazby zesílí (krok 4 na obr. 3). Na konci reakce se uvolňují produkty a volný enzym [1, 3, 6].



**Obr. 3 Enzymaticky katalyzovaná reakce [4]**

## 1.1.4 Specifita enzymů

Rozlišujeme substrátovou a účinkovou specifitu enzymů, která je daná vlastnostmi aktivního místa enzymu.

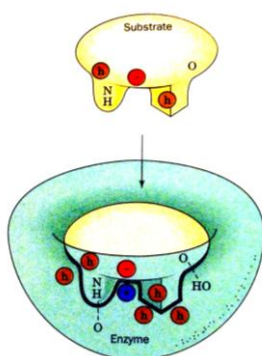
Substrátová specifita je zajišťována na několika úrovních [1, 3]:

- Strukturní specifita: Enzym rozpozná některé obecné strukturní rysy substrátu.
- Regiospecifita: Zajišťuje, aby katalýza proběhla ve specifické oblasti substrátu.
- Stereospecifita: Vzniká tím, že enzymy díky své přirozené chiralitě (proteiny se skládají pouze z L-aminokyselin), tvoří asymetrická vazebná místa. Například trypsin hydrolyzuje polypeptidy složené z L-aminokyselin, ale nikoli ty, které obsahuje D-aminokyseliny.
- Geometrická komplementarita: Místo vázající substrát se skládá z prohlubně či štěrbin na povrchu molekuly enzymu, která je strukturně komplementární k substrátu.
- Elektronická komplementarita: Aminokyselinové zbytky vazebného místa jsou uspořádány pro specifickou interakci se substrátem (obr. 4).

Rentgenové analýzy ukazují, že vazebná místa většiny enzymů jsou z větší části vytvořena předem, ale podstupují jisté strukturní změny při vazbě substrátu [1, 3].

Reakční specifita je schopnost enzymu katalyzovat jeden konkrétní typ reakce. Tentýž substrát může být tedy přeměňován několika enzymy s různou specifitou účinku na různé produkty (například aminokyseliny mohou být zbaveny  $\text{CO}_2$  dekarboxylázou, mohou být podrobeny účinku aminotrasferázy aj.) [3].

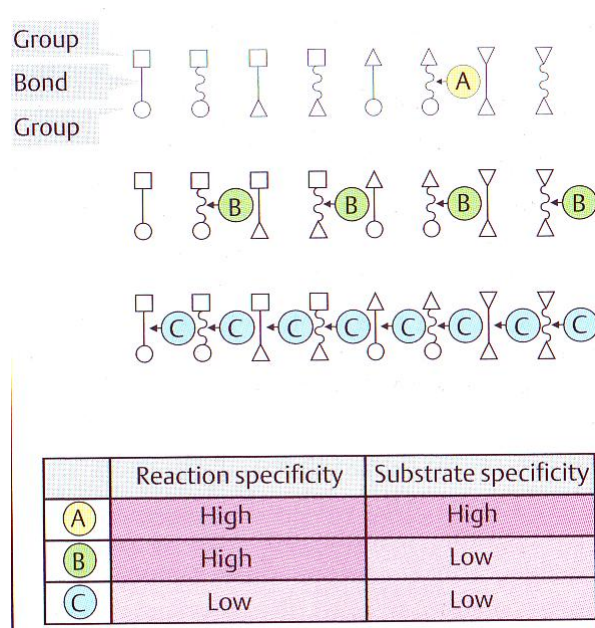
Specifický substrát je takový substrát, který má nízkou hodnotu Michaelisovy konstanty  $K_m$  a velkou hodnotu rychlostní konstanty enzymu  $k_{cat}$  (podrobněji v úvodu kapitoly 1.3) [6].



**Obr. 4 Komplex enzym-substrát [1]**

Porovnáním reakční a substrátové specifity lze enzymy zařadit do skupin. Vysoce specifické enzymy (typ A, v horní části obr. 5) katalyzují štěpení pouze jednoho typu vazby a pouze pokud struktura substrátu odpovídá jeho specifitě. Další enzymy (typ B, uprostřed obr. 5) mají úzkou reakční specifitu, ale širokou substrátovou specifitu. Enzymy typu C mají nízkou reakční specifitu i nízkou substrátovou specifitu. Enzymů charakterizovaných typem C není mnoho [4].





Obr. 5 Reakční a substrátová specifita [4]

### 1.1.5 Absorpce viditelného a ultrafialového záření

Ve viditelné oblasti absorbují pouze enzymy patřící mezi tzv. chromoproteiny, tj. obsahují barevné složky (např. hemové enzymy, flavoproteiny, metaloenzymy s barevnými ionty těžkých kovů v molekule). Všechny enzymy však absorbují ultrafialové záření a to v oblastech 260-290 nm a 180-190 nm. Za absorpci v oblasti 260-280 nm jsou odpovědné tzv. aromatické chromofory, které tvoří kruhy postranních řetězců fenylalaninu tyrosinu a tryptofanu. Kolem 180-190 nm pak vykazuje mohutnou absorpci peptidová vazba, jejíž absorpce je měřitelná ještě při 250 nm. Měření absorpce v této oblasti patří k základním metodám pro stanovení koncentrace roztoků enzymů a jejich změn, např. při kinetických měřeních, určování aktivity apod. [3]

## 1.2 Kinetika enzymatické reakce, rovnice Michaelise a Mentenové

Reakční rychlost  $v$  je definována časovým úbytkem látkového množství některé z výchozích látek nebo přírůstkem látkového množství některého z produktů reakce vztažením na stechiometrický faktor této látky. Pro reakci  $aA+bB+cC \rightarrow dD$  platí:

$$v = -\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{1}{b} \frac{d[B]}{dt} = -\frac{1}{c} \frac{d[C]}{dt} = \frac{1}{d} \frac{d[D]}{dt} \quad /1/$$

Definuje-li se okamžitá rychlost pouze vztahem

$$v_A = -\frac{d[A]}{dt} \quad \text{nebo} \quad v_D = \frac{d[D]}{dt}, \quad /2/$$

je nutno indexem vyznačit, ke které výchozí látce případně ke kterému produktu se rychlost vztahuje.

Rychlost reakce je přímo úměrná součinu okamžitých koncentrací výchozích látek:

$$v_A = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]^a[B]^b[C]^c \quad /3/$$

V případě vratných reakcí je výsledná rychlost vzhledem k složce A  $v_A$  definována rozdílem rychlostí reakce přímé a zpětné:

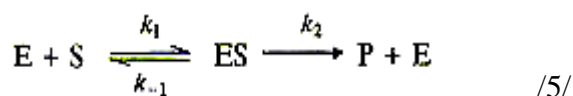
$$v_A = \bar{v}_A - \vec{v}_A = k_1[A][B] - k_{-1}[C][D] \quad /4/$$

V rovnici /4/ jsou  $k_1$  a  $k_{-1}$  rychlostní konstanty přímé a zpětné reakce. Po určité době se ustanoví rovnovážný stav, který je charakterizován neměnnými rovnovážnými koncentracemi a výsledná rychlost  $v_A$  je nulová [7].

Enzymová kinetika je odvětvím kinetiky chemické a proto sdílí tentýž formalismus [8]. Reakční rychlost  $v$  je definována časovým úbytkem látkového množství některé z výchozích látek nebo přírůstkem látkového množství některého z produktů reakce vztahením na stechiometrický faktor této látky [7].

Podstatou enzymové kinetiky je studium časového průběhu enzymových reakcí za různých reakčních podmínek. Rychlost enzymaticky katalyzované reakce závisí na koncentraci substrátů, množství enzymu, fyzikálně chemických vlastnostech prostředí, přítomnosti efektorů. Studium reakční kinetiky je užitečné při zkoumání reakčního mechanismu, dílčích kroků celkové reakce [2].

Celková enzymatická reakce je složena ze dvou elementárních reakcí, v nichž substrát tvoří s enzymem komplex, který se pak rozkládá na produkty a enzym:



$E$ ,  $S$ ,  $ES$  a  $P$  představují enzym (pro enzymy složené z několika identických podjednotek se  $E$  vztahuje spíše k aktivním místům než k molekulám enzymu), substrát, komplex enzym-substrát, a produkty. Tento mechanismus poprvé navrhl Henri v roce 1903 [6].

Pro tuto reakci platí:

- Rychlosti reakcí lze vyjádřit rychlostními rovnicemi  $v_1 = k_1[E][S]$ ,  $v_{-1} = k_{-1}[ES]$ ,  $v_2 = k_2[ES]$  [3].
- Reakční rychlost  $v$  lze také vyjádřit jako změnu v koncentraci za jednotku času (udávána v  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) [4]. Platí  $v_1 = -d[S]/dt = -d[E]/dt$ ,  $v_{-1} = -d[ES]/dt$ ,  $v_2 = -d[ES]/dt$  [8].

První krok reakce je velmi rychlý, dojde k rychlému ustanovení rovnováhy. Rychlost následné reakce, charakterizované rychlostní konstantou  $k_2$ , je malá. Pomalejší reakce určuje výslednou rychlost celého děje. Platí [7]:

$$v_0 = -\frac{d[ES]}{dt} = k_2[ES] = k_2 \frac{[S][E]_T}{K_m + [S]} \quad /6/$$

$K_m$  značí Michaelisovu konstantu a  $v_0$  počáteční rychlost reakce (podrobněji vysvětleno dále). Pro rychlost změny koncentrace substrátu ( $d[S]/dt$ ), pro změnu v koncentraci enzym-substrátového komplexu ( $d[ES]/dt$ ) a produktu ( $d[P]/dt$ ) lze proto napsat rovnice:

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] \quad /7/$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad /8/$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad /9/$$

kde levá část rovnic odpovídá výsledné rychlosti reakce vzhledem k látce, která je v čitateli zlomku, pravá část rovnic odpovídá rozdílu rychlostí reakce přímé a zpětné [7].

Koncentrace enzym-substrátového komplexu se mění mnohem pomaleji než koncentrace substrátu. Tudíž vzhledem k  $d[S]/dt$  je  $d[ES]/dt$  přibližně roven nule (neboli  $k_{-1}$  je podstatně větší než  $k_2$ ). Toto obecně platí pro případy, kdy je koncentrace substrátu podstatně větší než koncentrace enzymu, bez ohledu na hodnotu disociační konstanty komplexu enzym-substrát  $K_S$ . Díky vlastnosti  $d[ES]/dt \doteq 0$  lze z rovnice /8/ odvodit vztah:

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2} = \frac{[E][S]}{K_m} \quad /10/$$

Z celkové koncentrace enzymu v roztoku  $[E]_T$  je část enzymu volná  $[E]$  a část je v komplexu vázána se substrátem  $[ES]$ , platí tedy rovnice:

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad /11/$$

Z rovnice /11/ může být  $[E]$  dosazeno do rovnice /10/, čímž se získá vztah:

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_m} - \frac{[ES][S]}{K_m} \quad /12/$$

Po úpravě:

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_m + [S]} \quad /13/$$

V důsledku toho, že  $d[ES]/dt=0$ , lze z rovnic /7/, /8/ a /9/ odvodit vztah:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = v_0 = \frac{k_2[E]_T[S]}{K_m + [S]} \quad /14/$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad /15/$$

Pro většinu enzymaticky katalyzovaných reakcí, pro které jsou stanoveny konstanty  $k_1$ ,  $k_{-1}$  a  $k_2$ , je typické, že  $k_{-1}$  je podstatně větší než  $k_2$ ; v tomto případě je  $K_m$  možné zjednodušit:

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_S \quad /16/$$

Pro různé poměry  $[S]$  a  $K_m$  lze popsat tři následující situace:

- Pokud je  $[S] \ll K_m$ , pak je rychlost reakce odvozena od vztahu /14/:

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_T [S]}{K_m} \quad /17/$$

Protože je rychlost reakce za těchto podmínek přímo úměrná koncentraci substrátu, reakce je prvního řádu.

- Dalším speciálním případem je situace, kdy  $[S] = K_m$ ; pak lze rovnici /14/ upravit:

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_T}{2} = \frac{1}{2} V \quad /18/$$

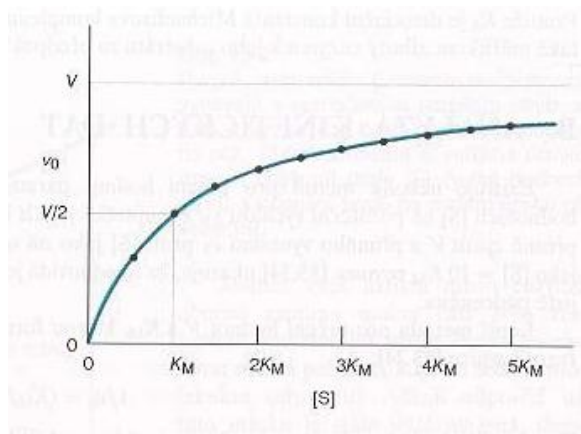
- Pokud  $[S] \gg K_m$  enzym se stává nasycený substrátem. Podobně jakmile  $[S] \gg K_m$ , jmenovatel v rovnici /14/ je roven  $[S]$  a tím je rovnice /14/ zredukována na vztah:

$$V = k_2 [E]_T \quad /19/$$

$V$  se nazývá limitní rychlost a je nezávislá na koncentraci substrátu. Závisí pouze na rychlostní konstantě  $k_2$  a celkové koncentraci enzymu [6]. Reakce je tedy nultého řádu [9]. V praxi to znamená, že přidáním substrátu do roztoku nevzroste rychlost reakce. Po dosažení výrazu za  $V$  ze vztahu /19/ do vztahu /14/:

$$v_0 = V \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad /20/$$

Vztah /20/ se nazývá rovnice Michaelise a Mentenové a je základní rovnicí enzymatické kinetiky [10]. Popisuje průběh pravoúhlé hyperboly, jaká je uvedena na obr. 6.



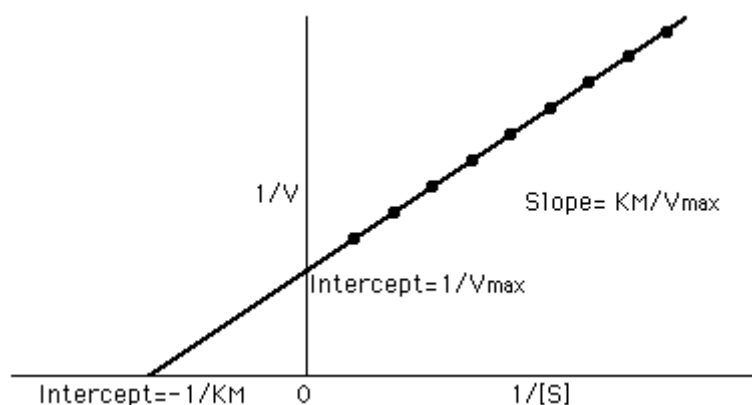
**Obr. 6** Závislost počáteční rychlosti  $v_0$  reakce Michaelise a Mentenové na koncentraci substrátu  $[S]$  [8]

Většina enzymatických reakcí je mnohem komplikovanější než znázorňuje reakce /5/. Mnoho metabolických enzymů vyžaduje vazbu koenzymů případně druhého dodatečného substrátu a v reakci enzym-substrátového komplexu bývá obvykle více kroků. Navzdory těmto komplikacím může být rychlostní rovnice /14/ aplikována.

Použití počáteční rychlosti  $v_0$  (což v praxi znamená rychlost měřenou před tím, než se asi 10 % substrátu přemění v produkt) místo rychlosti reakce minimalizuje takové nežádoucí faktory, jakými jsou rychlost obrácené reakce, inhibice enzymu produktem a postupná inaktivace enzymu [1].

Určit  $V$  a  $K_m$  z grafu, který je znázorněn na obr. 6, není snadné. Pro jednodušší vyhodnocení lze použít počítačové programy, případně lze upravit rovnici Michaelise a Mentenové do jednoduššího tvaru známého jako Lineweaver-Burkova závislost /21/, která odpovídá tvaru rovnice přímky  $y=a \cdot x+b$  (obr. 7).

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{S} \quad /21/$$



Obr. 7 Závislost  $1/V$  na  $1/S$  podle Lineweavera a Burka [10]

### 1.2.1 Význam a interpretace Michaelisovy konstanty $K_m$

Michaelisova konstanta  $K_m$  je hodnota, která popisuje koncentraci substrátu (udává se v jednotce mol/l [11]), při které je reakční rychlost rovna polovině limitní rychlosti enzymatické reakce [1].  $K_m$  popisuje rovnovážný stav reakce [4]. Je na aktuální celkové koncentraci enzymu nezávislá a je pro danou dvojici enzym-substrát charakteristickou konstantou. Proto se používá při vyjadřování afinity enzymu k určitému substrátu [11]. Konstanta je však závislá na prostředí (pH, teplota, přítomnost efektorů, tedy aktivátorů a inhibitorů) [3].

Enzym s malou hodnotou  $K_m$  dosahuje maximálního katalytického účinku (limitní rychlosti  $V$ ) při nízkých koncentracích substrátu [1]. Nízká hodnota  $K_m$  tedy značí velkou afinitu enzymu k substrátu [11]. Stačí pouze malé množství substrátu k tomu, aby byl enzym nasycen. Velká hodnota  $K_m$  značí, že je potřeba velké množství substrátu k dosažení limitní reakční rychlosti  $V$  [9].

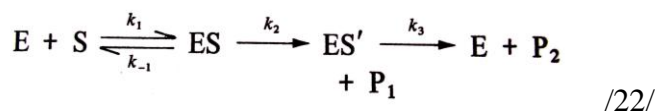
Další význam konstanty spočívá v možnosti odhadnout koncentraci substrátu nutnou pro dosažení limitní rychlosti reakce  $[S]_v = 10^2 K_m$ , a vypočítat pomocí rovnice počáteční rychlost enzymové reakce pro danou koncentraci substrátu, nebo naopak koncentraci substrátu nutnou k dosažení požadované rychlosti.

Vedle toho, že  $K_m$  charakterizuje daný enzym, je sledování  $K_m$  také nezbytné k odlišení mechanismu inhibice (nejčastěji typu kompetitivního nebo nekompetitivního) [11]. Znalost hodnoty  $K_m$  je rovněž užitečná pro přípravu reakčních podmínek [6].

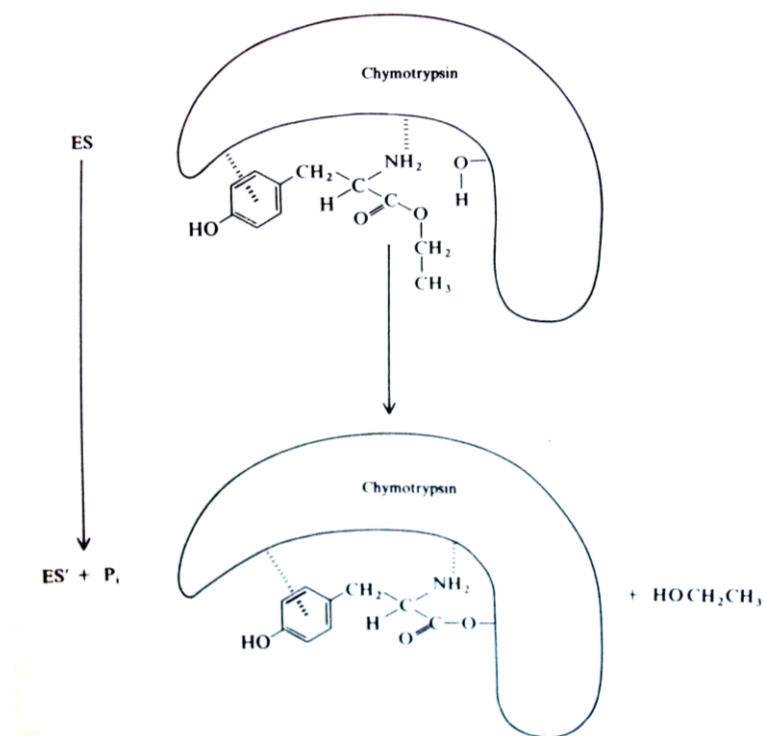
## 1.2.2 Komplikovanější reakční mechanismy

Pro komplikovanější mechanismy konstanta  $k_{cat}$  a  $K_m$  neodkazují na jediný krok; stávají se složenými konstantami zahrnujícími rychlostní konstanty několika kroků reakce.

Mechanismus působení několika hydrolytických enzymů je ukázán v rovnici:



Substrát chymotrypsinu se nejprve váže s enzymem za vytvoření enzym-substrátového komplexu, který vnitřními reakcemi za současného uvolňování ethylalkoholu  $P_1$  dává vzniknout acylenzymu  $ES'$ . Acylenzym je novým esterem, ve kterém karboxylová kyselina (část původního esteru) reagovala s hydroxylovou skupinou serinového zbytku molekuly enzymu (obr. 8). Acylenzym velmi rychle reaguje s vodou a tím se regeneruje volný enzym a tyrosin  $P_2$ .



Obr. 8 Mechanismus uvolnění ethylalkoholu  $P_1$  v průběhu enzymatické reakce [6]

Rychlost reakce /14/ je stále aplikovatelná na model rovnice /22/. Vztahy, které jsou popisovány pomocí konstant  $k_{cat}$  a  $K_m$  mohou být také použity, ale zmíněné konstanty jsou nově definovány:

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} ; \quad K_m = \frac{k_3}{k_2 + k_3} \cdot \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad /23/$$

Tudíž  $k_{cat}$  je složena ze dvou konstant reakce prvního řádu  $k_2$  a  $k_3$ .  $K_m$  je funkcí všech rychlostních konstant. Tyto vztahy lze obvykle zjednodušit [6].

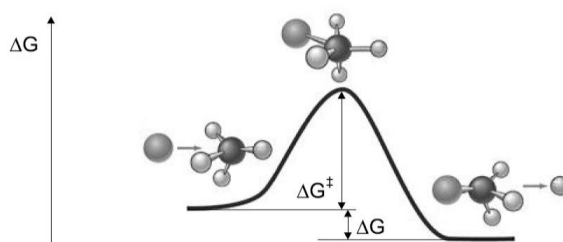
### 1.2.3 Aktivační energie

Samovolnému přechodu reaktantů na produkty brání určitá energetická bariéra. Energie, která musí být do reagujícího systému dodána, aby došlo k překonání této bariéry a tím k realizaci reakce, se v chemické kinetice nazývá aktivační energie.

Protože reakce probíhá uvnitř aktivního centra, v němž jsou reaktanty pevně připoutány, nemůže být aktivační energie získána z kinetické energie pohybujících se molekul, jako u reakcí v roztoku. Zdrojem aktivační energie tedy musí být molekula enzymu, která funguje jako rezervoár a převodník energie [3].

### 1.2.4 Teorie přechodného stavu

V reakci  $A+B \rightarrow P+Q$  se  $A$  a  $B$  musí přiblížit tak, že v jednom bodě reakce existuje komplex, který má vysokou energii a je nestabilní. Reakční dráha s minimální energií se označuje jako reakční koordináta [1]. Reakční koordináta znázorňuje 2D projekci nejsnazší cesty, která spojuje oblasti reaktantů a produktů (obr. 9) [12].



**Obr. 9 Reakční koordináta**

*Energetické maximum na reakční koordinátě bývá ztotožňováno s tranzitním stavem [12]*

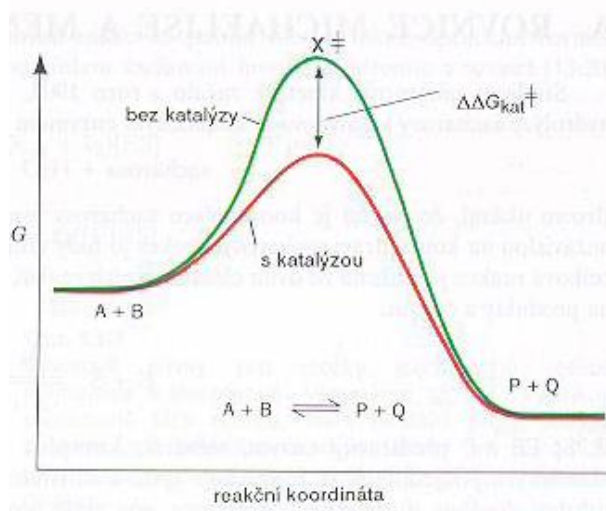
Diagram závislosti potenciální energie soustavy  $A+B$  na reakční koordinátě je nazýván diagram přechodného stavu. Reaktanty a produkty jsou stavy s minimální volnou energií a přechodný stav odpovídá na reakční koordinátě bodu s nejvyšší energií. Pokud jsou atomy v reakčním systému různé podobně jako v reakci  $A+B \rightarrow X^\ddagger \rightarrow P+Q$ , kde  $X^\ddagger$  symbolizuje přechodný stav, pak diagram přechodného stavu není symetrický díky rozdílu energie reaktantů a produktů.  $\Delta G^\ddagger$  je Gibbsova energie přechodného stavu a je známa jako aktivační energie [1].

Aktivační energie je složena ze dvou typů energií jak znázorňuje rovnice:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

$\Delta H^\ddagger$  je aktivační entalpie ( $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $T$  je absolutní teplota (K),  $\Delta S^\ddagger$  ( $\text{cal}\cdot\text{deg}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) je aktivační entropie. Entalpie je tepelná energie, projev pohybu molekul. Entropie je veličina, jež je chápána jako míra neuspořádanosti či nahodilosti orientace systému. Ve chvíli, kdy se systém stává neuspořádaným, entropie vzrůstá [6].

Katalyzátory způsobují snížení aktivační bariéry katalyzované reakce. O účinnosti katalyzátoru vypovídá  $\Delta\Delta G_{cat}^\ddagger$ . Jestliže katalyzátor sníží aktivační bariéru reakce o  $\Delta\Delta G_{cat}^\ddagger$ , potom se rychlost reakce zvýší. Katalyzátor snižuje kinetickou bariéru o stejnou hodnotu pro oba směry reakce (obr. 10). Následkem toho katalyzátor zrychluje zároveň jak přímou tak i zpětnou reakci, takže rovnovážná konstanta reakce zůstává nezměněna. Katalyzátor také nemění volné energie počátečního ani konečného stavu reakce a tím neovlivňuje  $\Delta G^0$  [1, 6].



Obr. 10 Účinek katalyzátoru na diagram přechodového stavu reakce [8]

## 1.2.5 Katalytická aktivita enzymu

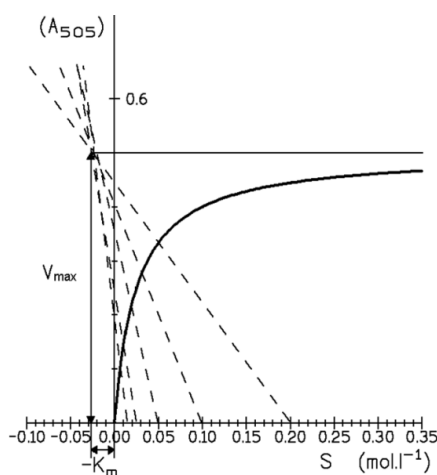
Jednotkou používanou pro vyjádření katalytické aktivity enzymů je *katal* (zkráceně *kat*), který je vyjádřen jako takové množství enzymové aktivity, které katalyzuje přeměnu jednoho molu substrátu za sekundu [4]. Uvedená jednotka je ovšem pro praxi příliš velká. Ve většině případů je vhodnější vyjádření v *mikrokatal* ( $\mu\text{kat}$ )= $10^{-6}$  kat, *nanokatal* ( $\text{nkat}$ )= $10^{-9}$  kat a *pikokatal* ( $\text{pkat}$ )= $10^{-12}$  kat. Výsledky laboratorních vyšetření v séru jsou nejčastěji vyjadřovány v jednotce  $\mu\text{kat/l}$  [11]. Katalytickou aktivitu výrazně ovlivňuje tvorba komplexů se substráty a interakce s různými látkami (koenzymy, aktivátory, inhibitory) [3].

## 1.2.6 Analýza kinetických dat

K určení kinetických parametrů  $K_m$  a  $V$  lze použít metodu počátečních rychlostí. Proveďte sérii měření časového průběhu enzymatické reakce při konstantní koncentraci enzymu a pro



5-6 různých koncentrací substrátu za stejných podmínek (pH, teplota, složení prostředí). Z hodnot počátečních rychlostí  $v_0$  (získaných z extrapolací křivek reakční rychlosti v čase  $t \rightarrow 0$ ) a jim odpovídajících  $[S]$ , můžeme pomocí vztahu Michaelise a Mentenové zjistit parametry  $K_m$  a  $V$  numerickým výpočtem. Pro rychlé (informativní) stanovení těchto veličin existuje několik metod grafických. Jednou z nich je použití Lineweaverova a Burkova grafu, založeného na použití přetransformovaného lineárního vztahu Michaelise a Mentenové (obr. 7) [3]. Tato metoda je však zatížena značnou chybou při nízkých koncentracích substrátu  $S$ . Je jí možné nahradit výpočtem z rovnice rovnosé hyperboly. Grafickým vyjádřením této matematické závislosti je vynesení experimentálních hodnot  $v_0$  na ose  $y$  proti příslušným hodnotám  $S$  na ose  $x$  podle Eisenthala a Cornishe-Bowdena (obr. 11) [11].



Obr. 11 Vynesení podle Eisenthala a Cornish-Bowdena [11]

### 1.2.7 Fotometrické metody stanovení katalytické aktivity enzymů, BioPhotometer plus

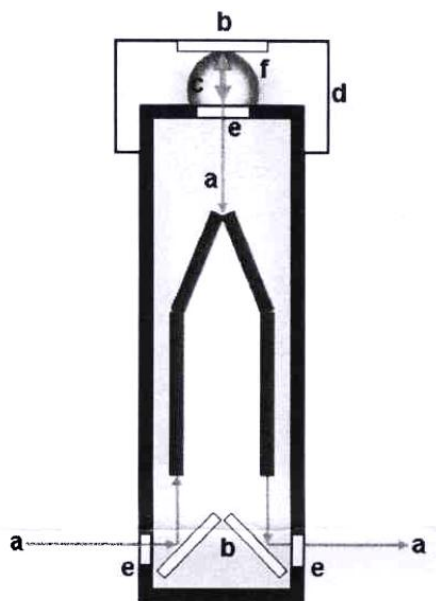
Fotometrické metody stanovení katalytické aktivity enzymů jsou založeny na skutečnosti, že změna koncentrace substrátu nebo produktu za jednotku času je přímo úměrná změně absorbance za stejný časový interval. Změnu koncentrace substrátu nebo produktu lze sledovat přímo, vykazuje-li absorbanci ve viditelné nebo ultrafialové části spektra. Vztah absorbance a stanovované koncentrace je definován Lambertovým Beerovým zákonem  $A = \epsilon \cdot c \cdot d$ , kde  $A$  je absorbance,  $\epsilon$  molární absorpční koeficient ( $\text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $c$  koncentrace ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a  $d$  tloušťka absorbující vrstvy (cm).

Reakční rychlost je možné vyjádřit jako časovou změnu absorbance  $\Delta A / \Delta t$ . Úbytek nebo přírůstek absorbance lze měřit bodově, tj. v určitých zvolených intervalech odečíst hodnotu absorbance. Obvykle se odečítá v 0,5 až 1 minutových intervalech po dobu 3-5 min [3].

Pro spektrofotometrická stanovení katalytické aktivity enzymů lze použít BioPhotometer plus, který nabízí levnou alternativu ke klasickým spektrofotometrům s několika výhodami, jimiž jsou jednoduchá manipulace, pohodlné vyhodnocování dat a malá spotřeba vzorků, která se pohybuje v rozmezí 0,7-5  $\mu\text{l}$ . Touto technikou lze reprodukovatelně analyzovat

vysoce koncentrované vzorky za použití velmi krátkých světelných drah (0,2 nebo 1 mm místo obvyklých 10 mm).

Princip měření je znázorněn na obr. 12. Světelný paprsek fotometru (a) je směřován do nitra měrné cely skrz okénko (e), odrazí se od zrcadla (b) směrem nahoru a je veden přes další okénko (e) do vzorku (c). Ve víčku (d) je paprsek zrcadlem (b) odražen a veden zpět do měrné cely. Pomocí dalšího zrcadla je veden ven z kyvety. Detektor zaznamenává úbytek záření po průchodu vzorkem (absorpci). Délka optické dráhy (f) je vzdálenost mezi zrcadlem a horním výstupním okénkem měrné cely a je důležitá pro stanovení koncentrace vzorku.



*Obr. 12 Schematické znázornění kyvety Hellma (TrayCell)*

*Popisky obrázku jsou uvedeny v textu*

Výrobci doporučují použití objemů 3-5  $\mu\text{l}$  pro 1 mm víčko a 0,7-3  $\mu\text{l}$  pro 0,2 mm víčko. Pro objemy nižší než 2  $\mu\text{l}$  je doporučeno pipetovat vzorek přímo na okénko (e) na vnitřní straně víčka, místo obvyklého pipetování na vrchní zrcadlo (b).

### **1.2.8 Požadavky na metodu vyšetřující aktivitu enzymů**

Metoda zjišťující aktivitu enzymů je dostatečně specifická za předpokladu, že na substrát působí v daném materiálu jen jeden enzym. Je i dostatečně citlivá a přesná, je-li zvolena vhodná koncentrace substrátu vzhledem k enzymu a vhodná metoda stanovení úbytku substrátu nebo přírůstku produktu v čase, neboli vhodná metoda stanovení rychlosti přeměny substrátu na produkt.

Katalytický charakter enzymů a tedy i jejich aktivita jsou ovlivňovány mnoha faktory, které musí být všechny optimalizovány a kontrolovány, jestliže měření aktivity má být reprodukovatelné a hodnoty využitelné. Mezi tyto faktory patří fyzikální veličiny (teplotu a tlak), chemický charakter roztoku (hodnota pH, iontová síla) a koncentrace příslušných substrátů, kofaktorů a inhibitorů [4].

Aby byla zajištěna srovnatelnost těchto změn v jednotlivých časových intervalech, je účelné, aby úbytek substrátu nebo přírůstek produktu v čase byl lineární, tj. aby reakce probíhala podle kinetiky nultého řádu s konstantní rychlostí  $v$ . Toho by bylo dosaženo jen tehdy, kdyby veškerý enzym byl substrátem nasycen, tj. kdyby veškerý enzym o celkové koncentraci  $[E_T]$  byl vázán ve formě enzym-substrátového komplexu  $ES$ , což je možné jen při velkém nadbytku substrátu. Pak by enzymatická reakce probíhala limitní rychlostí  $V$  [11].

### 1.3 Enzymy pankreatu, trypsin

Tělo člověka potřebuje stálý přísun aminokyselin pro růst a opravy. Proteiny jsou velmi odolné, proto se na jejich trávení účastní enzymy. Trávení proteinů začíná v žaludku, kde kyselina chlorovodíková rozkládá proteiny a kde enzym pepsin započne hrubé trávení proteinů. Intenzivnější trávení začíná v intestinu. Pankreas produkuje enzymy, z nichž nejvýznamnější trypsin štěpí proteinové řetězce na řetězce obsahující jen několik aminokyselin. Poté enzymy produkované enterocyty tyto krátké řetězce štěpí až na jednotlivé aminokyseliny, které jsou využity pro potřeby organismu [13].

V acinárních buňkách žlázy tvoří pankreas sekret o alkalickém pH díky obsahu hydrogenuhličitanových iontů. Sekret pankreatu obsahuje také mnoho enzymů, které katalyzují hydrolýzu vysokomolekulárních látek přijímaných potravou. Každý z těchto enzymů je hydroláza s optimálním pH prostředí v oblasti neutrální nebo slabě alkalické. Mnoho z nich je tvořeno ve formě proenzymů. Tyto proenzymy jsou sekretovány pankreatem přes *ductus pancreaticus* do dvanáctníku (horního úseku tenkého střeva) a dále aktivovány v lumen střeva [1, 4, 14]. Mezi enzymy sekretované pankreatem patří [4]:

Enzymy hydrolyzující proteiny (serinové proteázy):

- Trypsin
- Chymotrypsin
- Elastáza

Enzym hydrolyzující sacharidy:

- $\alpha$ -amyláza

Enzymy hydrolyzující lipidy:

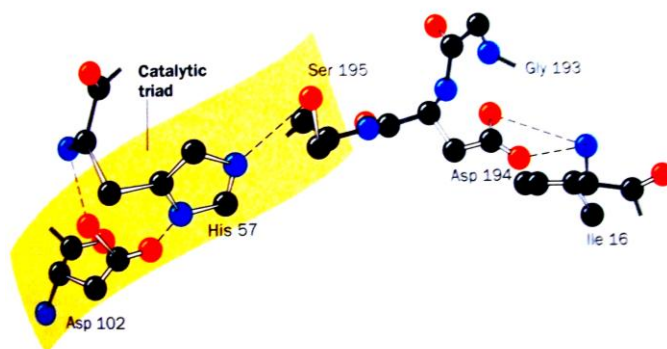
- Lipáza
- Fosfolipáza A2
- Sterol esteráza

Enzymy hydrolyzující nukleové kyseliny:

- Ribonukleáza
- Deoxyribonukleáza

Serinové proteázy mají podobnou jak primární tak i terciální strukturu [15]. Primární struktura těchto monomerních enzymů je ze 40 % identická a jejich vnitřní sekvence jsou téměř stejné. Každý z těchto proteinů je složen do dvou domén, které obsahují rozsáhlé oblasti antiparalelních  $\beta$ -skládaných listů uspořádaných do soudkovitého tvaru, ale obsahují i malé množství  $\alpha$ -helikálních struktur [1].

Aktivní centrum serinových proteáz má tvar mělké prohlubně, jak je popsáno v úvodu kapitoly 1.1 [2]. Obsahuje reaktivní serinový zbytek. Serin se podílí kovalentně při katalýze [16]. Katalyticky významné His<sup>57</sup> a Ser<sup>195</sup> jsou umístěny ve vazebném místě pro substrát společně s Asp<sup>102</sup>, který je zanořen v kapse nepřístupné pro rozpouštědla. Tyto tři aminokyseliny vytvářejí uspořádání spojené vodíkovými můstky, označované jako katalytická triáda (obr. 13) [1]. Katalytická triáda působí jako střídavý donor a akceptor protonů (acidobazická katalýza) [8].



*Obr. 13 Katalytická triáda [1]*

Příklady serinových proteáz [4]:

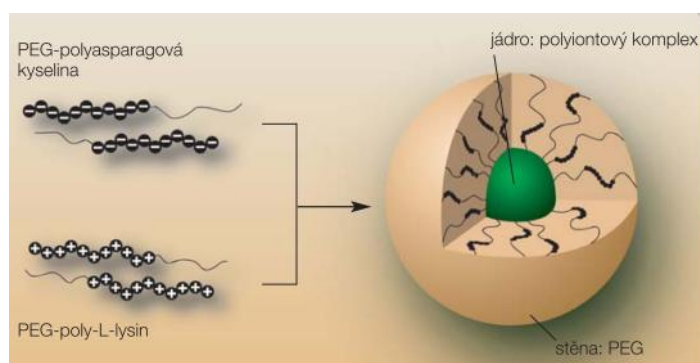
- Trávicí enzymy trypsin, chymotrypsin, elastáza (tyto enzymy mají odlišnou specifitu pro postranní řetězce, lemující štěpenou peptidickou vazbu)
- Mnoho koagulačních faktorů
- Fibrinolytické enzymy, plasmin
- Aktivátory plasminu

Trypsin je pankreatická serinová proteáza se substrátovou specifitou na pozitivně nabitě řetězce lysinu a argininu. Je středně velikým globulárním proteinem a je produkován jako neaktivní proenzym trypsinogen.

Kühne v roce 1876 popsal proteolytickou aktivitu enzymu a pojmenoval ho. Porovnal optimální pH pro reakce pepsinu a trypsinu. V roce 1974 byla objevena 3D struktura trypsinu. Na konci 90. let byl zjišťován vliv trypsinu na dědičnost pankreatitidy a bylo zjištěno, že mutace v Arg<sup>117</sup> zabrání autolýze a tím způsobí rozvoj pankreatitidy. Dnes je trypsin mimo jiné užíván k odhalení chování buněk a tkáňových kultur identifikací proteinu technikami proteinového sekvenování. V medicíně byla role trypsinu předmětem rozšířeného výzkumu a byl zkoumán jeho vliv na choroby pankreatu zahrnující cystickou fibrózu a

chronickou pankreatitis (někdy smrtelný stav, který může být navozen poraněním slinivky). Dále byl pomocí trypsinu modelován rozpad kloubní chrupavky při osteoartritidě [17].

Bylo dokázáno, že enzymatickou reakci trypsinu lze patnáctkrát zrychlit tvorbou komplexu s PEG-PAA (*polyacrylic acid-polyethylene glycol*). Podstatou tohoto urychlení je stabilizace imidazoilového iontu histidinového zbytku katalytické triády trypsinu díky aspartátu, který je součástí PEG-PAA. Směs enzymu s PEG-PAA spontánně utvoří polyiontové komplexní micely (obr. 14), v kterých polyiontové jádro trypsinu a PAA je obklopeno vrstvou PEG [18]. Výhodou je konstantní velikost těchto micel a citlivost na změnu podmínek. Micely s inkorporovanými enzymy odpovídající na změnu koncentrace soli mění stabilitu a funkčnost enzymů a jsou využitelné pro biotechnologické a medicínské účely [19].



**Obr. 14 Formování polyiontových komplexních micel[19]**

### 1.3.1 Klasifikace trypsinu

Systém klasifikace enzymů byl vyvinut tak, aby bral v úvahu reakční i substrátovou specifitu enzymu. Každý enzym je zapsán v Katalogu enzymů (*Enzyme Catalogue*) čtyřmístným číselným kódem (*Enzyme Commission number*; tj. *EC number*). První číslo značí členství v jedné ze šesti hlavních tříd. Další dvě indikují podtřídu a skupinu. Poslední číslo značí důvod začlenění enzymu do skupiny. Enzymy s podobnou reakční specifitou jsou sjednoceny do hlavních šesti tříd [3, 4]:

Třída 1: Oxidoreduktázy (katalyzují redukčně-oxidační reakce)

Třída 2: Transferázy (katalyzují transport skupin z jedné na jinou molekulu)

Třída 3: Hydrolázy (cílová vazba enzymů štěpena hydrolyticky)

Podtřída 3. n: Podle toho, jaký typ vazby je hydrolyzován

3.1 Hydrolýza esterových vazeb (esterázy)

3.2 Hydrolýza glykosidické vazby

3.3 Hydrolýza etherové vazby

3.4 Hydrolýza peptidové vazby (peptidázy)

3.4.21 Serinové proteázy (endopeptidázy)

3.4.21.4 Trypsin

3.5 Hydrolýza jiných amidických vazeb (amidázy)

3.6 Hydrolýza vazby anhydridů

### 3.7 Hydrolýza C-C vazby

Třída 4: Lyázy (štěpí či formují vazby bez oxidativních nebo hydrolytických kroků)

Třída 5: Izomerázy (katalyzují změny v rámci jedné molekuly)

Třída 6: Ligázy (spojují dvě molekuly hydrolýzou energeticky bohatých vazeb)

## 1.3.2 Sekrece prekursoru trypsinu a jeho aktivace

Prekurzorem (zymogenem) trypsinu je trypsinogen [4]. Pokud by byl enzym syntetizován v aktivní formě, tkáň, která ho syntetizuje, by jím byla natrávena (důsledkem může být akutní pankreatitida) [8]. Zymogeny jsou skladovány v granulách zvaných zymogenní granula, která mají stěny odolné proti enzymovému rozkladu. Zymogeny trypsinu, chymotrypsinu a elastázy nejsou enzymaticky aktivní, ačkoli obsahují všechny potřebné katalytické skupiny, protože specifická kapsa zymogenu je nevhodně formována [4]. Tento typ kovalentní regulace enzymové aktivity je jednostranný. Nejsou známy enzymové reakce, které by přeměňovaly aktivní enzymy zpět na příslušné zymogeny [2].

Aktivace trypsinogenu na trypsin je relativně pomalá zřejmě proto, že neobvykle velký negativní náboj evolučně pevně ustáleného N-koncového hexapeptidu odpuzuje Asp na zadní straně specifické prohlubně trypsinu. Aktivace trypsinogenu probíhá dvoustupňovým procesem. Jakmile trypsinogen vstoupí z pankreatu do dvanáctníku, dochází k štěpení hexapeptidu na N-konci pomocí enteropeptidázy (enterokinázy), která je specifickou serinovou proteázou lokalizovanou v membráně epitelu intestina, v buňkách enterocytů. K proteolytickému štěpení, aktivovanému trypsinogenem, dochází mezi Lys<sup>15</sup> a Ile<sup>16</sup>, takže N-koncovou aminokyselinou se stává Ile<sup>16</sup>. Produkt štěpení ( $\beta$ -trypsin) je už katalyticky aktivní a štěpí další molekuly trypsinogenu (autokatalytická aktivace). Prekurzory chymotrypsinu, elastázy, karboxypeptidázy A a dalších jsou aktivovány trypsinem taktéž [4, 8, 20].

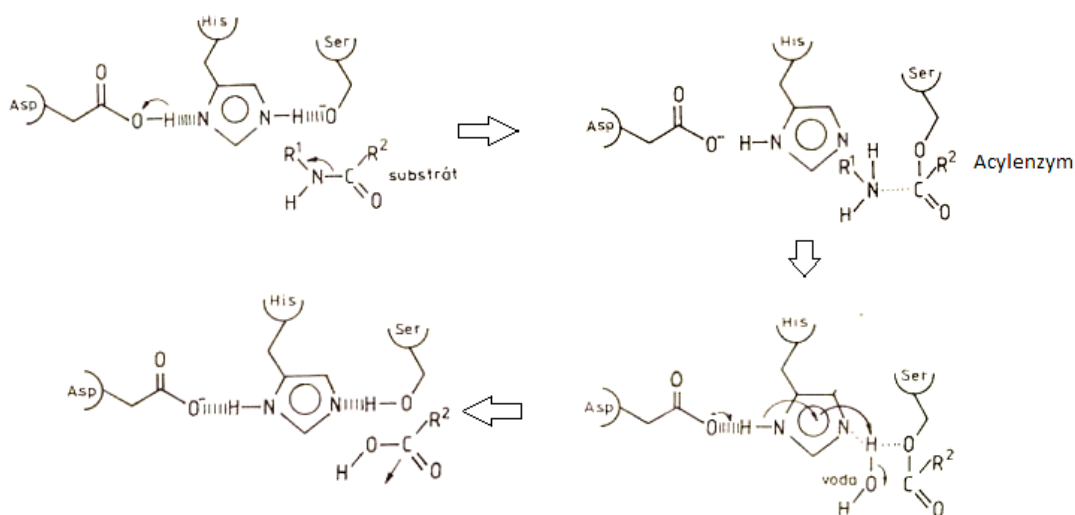
Předčasnou aktivaci střevního enzymu brání pankreatický sekreční inhibitor trypsinu (*pancreatic secretory trypsin inhibitor* PSTI). Funkce PSTI hraje důležitou roli v ochranném mechanismu, který brání destrukci tkáně autofágy, což by mohlo vést k onemocněním jako například pankreatitida a rakovina slinivky. Tyto choroby jsou jedněmi ze světově nejvíce rozšířených civilizačních chorob [21].

U skotu je možné pozorovat 2 formy trypsinu, dominantní kationickou a minoritní anionickou. Proteinová sekvence těchto enzymů je ze 72 % identická [17]. Lidský pankreas exkretuje tři izoformy. Kationická a anionická forma jsou převládajícími izoformami u lidí. K inhibitoru rezistentní mezotrypsinogen se vyskytuje pouze ve stopovém množství. Trypsin sestává ze samotného polypeptidového řetězce o 223 aminokyselinových zbytcích (trypsinogen z 229 aminokyselin). Tato nativní forma trypsinu je označována jako  $\beta$ -trypsin. Výsledkem autolýzy  $\beta$ -trypsinu (který je štěpen mezi Lys<sup>131</sup> a Ser<sup>132</sup> v sekvenci bovinního trypsinu) je  $\alpha$ -trypsin, který je stabilizován disulfidickými můstky [22].

### 1.3.3 Katalytický mechanismus trypsinu

Trypsin specificky štěpí peptidové vazby, na nichž se podílejí karboxylovou skupinou bazické aminokyseliny (Lys a Arg) [3]. Mechanismus štěpení je znázorněn na obr. 15.

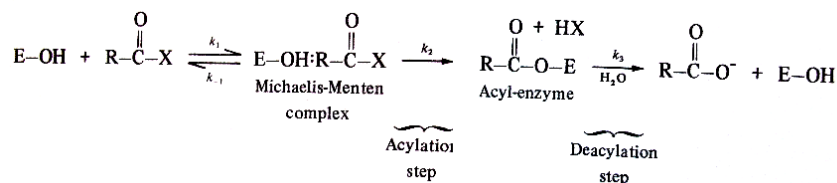
1. Vazba substrátu (polypeptidového řetězce) do aktivního centra vyvolá pomocí nábojové štafety vznik záporného náboje na kyslíkovém atomu hydroxylové skupiny reaktivního zbytku serinu a tím vzrůst jeho nukleofility [3], která je podpořena histidinem a aspartátem (histidylový zbytek přijímá proton od zbytku serinu a funguje tedy jako bazický katalyzátor). Serinový zbytek atakuje karbonylovou skupinu štěpeného peptidu. Místo štěpení substrátového peptidu je lokalizováno na lysinovém zbytku na C-konci peptidu [4].
2. Přenosem protonu z bližšího dusíkového atomu imidazolového kruhu, který je součástí nábojové štafety, na atom dusíku substrátu dojde k přerušení peptidové vazby N–C a vytvoří se první reakční produkt  $R_1NH_2$ . Imidazolový kruh tentokrát funguje jako kyselý katalyzátor usnadňující uvolnění produktu  $R_1NH_2$ . Zbývající část substrátu  $R_2CO-$  se pak kovalentně váže acylovou skupinou na zbytek serinu. Vzniklý kovalentní meziprodukt se nazývá acylenzym.
3. Druhý stupeň reakce je podobně jako první zahajován nukleofilním atakem, prováděným tentokrát molekulou vody, která vstupuje do reakce. Její proton vytvoří vodíkovou vazbu mezi dusíkovým atomem imidazolového kruhu a hydroxylovou skupinou zbytku serinu a –OH se naváže na acyl štěpeného substrátu.
4. Uvolnění druhého produktu  $R_2COOH$  je opět usnadněno kyselou katalýzou a složky nábojové štafety aktivního centra enzymu se při tom uvedou do původního stavu. Regeneruje se aktivní enzym [3].



Obr. 15 Katalytický mechanismus trypsinu a ostatních serinových proteáz [3]

Komplex nekovalentně vázaného enzymu a substrátu, tedy Michaelis-Mentenové komplex, je charakteristický pro všechny enzymaticky katalyzované reakce specifických substrátů. Acylenzymový intermediát ( $R-COO-E$ ) naznačuje, že jedním typem katalýzy v průběhu reakce je katalýza nukleofilní. Druhý krok, který charakterizuje rychlostní

konstanta  $k_2$ , je acylační. Posledním krokem charakterizovaným rychlostní konstantou  $k_3$  je deacylační krok (obr. 16) [6].

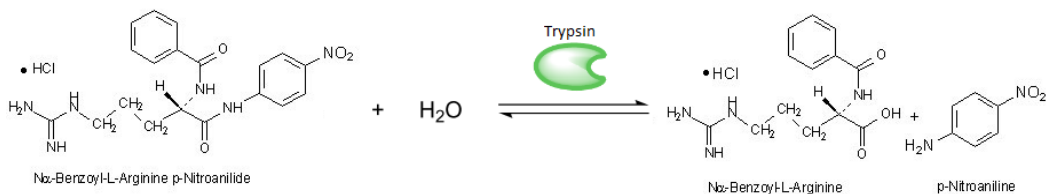


Obr. 16 Mechanismus katalýzy trypsinu [6]

### 1.3.4 Reakce trypsinu s $N\alpha$ -bezoyl-L-arginin-p-nitroanilid hydrochloridem (BAPNA)

Známé a klinicky používané substráty trypsinu jsou aromatické amidy  $N\alpha$ -chráněného argininu. Jako „chránicí skupina“ je zde myšlena skupina, jejímž úkolem je chránit funkční skupinu proti nežádoucím reakcím. Po využití může být protektivní skupina odstraněna. Při hydrolýze těchto substrátů se amidická vazba štěpí za vzniku aromatického aminu. V případě substrátu BAPNA, štěpením amidické vazby vzniká žlutě zbarvený p-nitroanilin, který lze stanovit spektrofotometricky (obr. 17). BAPNA patří mezi substráty, které jsou komerčně dostupné a lze ho použít pro kalorimetrická popřípadě fluorimetrická měření. Dalšími analogickými substráty jsou například  $N\alpha$ -benzoyl-L-arginin-7-amido-4-methyl coumarin a BANA (*L*-arginin  $\beta$ -naftylamid) [23]. Reakce posledního jmenovaného substrátu s trypsinem je také předmětem experimentálního zkoumání prezentovaného v mnoha odborných člancích [24, 25].

Aromatické estery argininu nejsou jako substráty trypsinu využívány, protože jsou ve srovnání s amidy méně stabilní vůči hydrolýze. Jsou často zabudovány do substrátu v místě amidů za účelem získání citlivějších a snadněji hydrolyzovatelných analogů. Jsou také náchylnější k neenzymatickým hydrolýzám nukleofily. Je potřeba disponovat substrátem trypsinu, který řeší nedostatky dosavadního stavu instrumentálních technik, což zahrnuje mimo jiné požadavky na klinické vzorky krve [23].



Obr. 17 Reakce trypsinu a  $N\alpha$ -bezoyl-L-arginin-p-nitroanilid hydrochloridem



## 1.4 Mikrokolorimetrie

Kolorimetrie je experimentální technika, která se zabývá měřením energie ve formě tepla. Jelikož různé druhy energie (zářivou energii, elektrickou či chemickou) lze za vhodných podmínek převést kvantitativně na teplo, je možné kalorimetrické metody využívat ve fyzice, biofyzice, chemii a biologii. Princip kolorimetrie spočívá v převedení měřené energie na teplo  $Q$  (J), které se vypočítá pomocí vztahu  $Q = C_k \cdot \Delta T$  (na základě změřené hodnoty  $\Delta T$ ), kde tepelná kapacita kalorimetru  $C_k$  ( $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}$ ) závisí na uspořádání měření [26, 27]. Klasická kolorimetrie poskytuje vysoké rozlišení a přesnost při měření tepla a tepelných toků pouze v případě, když množství vzorků a tepelné podíly nejsou příliš malé [28]. V mnoha případech ale není klasická kolorimetrie vhodná pro studium biochemických procesů vzhledem k vysokým požadavkům na materiál a časovou náročnost. Řešením tohoto problému je miniaturizace kalorimetru založeného na čípech s termočlánky nebo termistory [29, 30].

Mikrokolorimetr použitý v této práci slouží k měření termodynamických a kinetických vlastností kapalin v množství vzorku v řádu mikrolitrů. Měřicí jednotkou je křemíkový čip, na jehož aktivní oblasti (membráně) dochází k ustavování tepelné rovnováhy [26, 27]. Prvně použil křemíkové čipy v kolorimetrii Wolf [31]. Do trojrozměrné struktury čipu je zabudována membrána, která plní tři funkce: funkci termočlánku, ohříváče a „držáku“ vzorku [26, 27].

Mikrokolorimetrie je jedna z metod používaných k analyzování biochemických procesů, jako jsou enzymaticky katalyzované reakce nebo metabolická aktivita mikroorganismů či živých buněk [32].

### 1.4.1 Reakční teplo, entalpie a biologické systémy

Všechny chemické reakce probíhají s určitým tepelným zabarvením. Reakce, při kterých se uvolňuje teplo ( $\Delta H$  je záporná), se nazývají exotermické a ty, při nichž se teplo pohlcuje ( $\Delta H$  je kladná), se nazývají endotermické. Výměna tepla se stanovuje jako změna entalpie  $\Delta H$  (reakční teplo). Entalpie  $H$  je definována vztahem  $H = U + pV$ ,  $\Delta H = Q_p$  je teplo přijaté uzavřenou soustavou při konstantním tlaku.

Entalpie  $H$ , stejně jako vnitřní energie  $U$ , jsou stavové veličiny. Z matematické formulace první věty termodynamické plyne, že změna vnitřní energie  $U_2 - U_1$  tohoto systému je rovna:

$$\Delta U = U_2 - U_1 = Q_p + W = Q_p - \int_{V_1}^{V_2} p dV \quad /24/$$

Pokud je systém uzavřený a vyloučíme-li jiné možnosti výměny práce s okolím (např. práci elektrickou), může tento systém při konstantním tlaku konat jen objemovou práci, vyjádřenou členem s integrálem. Protože jde o izobarický děj, platí  $U_2 - U_1 = Q_p - p(V_2 - V_1)$ , odkud  $Q_p = U_2 + pV_2 - U_1 - pV_1 = H_2 - H_1 = \Delta H$ . Pro jakoukoli změnu stavu systému je změna

entalpie rovna  $\Delta H = H_2 - H_1 = U_2 + p_2 V_2 - U_1 - p_1 V_1 = \Delta U + \Delta(pV)$ , ale pouze pro izobarický děj platí  $\Delta H = \Delta U + p\Delta V$  ( $p = konst.$ ).

Podle obecné definice entalpie přispívá za konstantního tlaku k rozdílu mezi  $\Delta U$  a  $\Delta H$  změna objemu soustavy. Pokud děj probíhá v kondenzovaných systémech (kapalných nebo pevných), je teplotní změna jejich objemu při konstantním tlaku obvykle jen velmi malá. Jestliže ani tlak není příliš vysoký, pak zde platí, že  $\Delta H \approx \Delta U$ , to znamená, že za běžných „biochemických“ podmínek je změna entalpie skutečně rovna teplu přijatému systémem v průběhu studovaného děje [33].

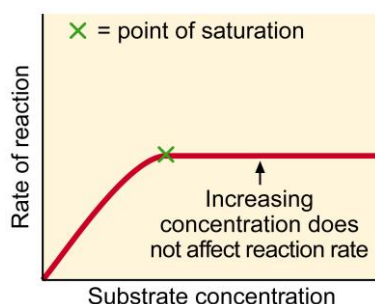
Vztahy chemické termodynamiky a její zákonitosti platí i pro systémy biologické. Tyto systémy však vykazují některé zvláštní rysy, na něž je nutné brát ohled při jejich termodynamické analýze. Termodynamika rozlišuje systémy otevřené, uzavřené a izolované. Biologické systémy, tedy živé jednobuněčné i komplexní mnohobuněčné organizmy, jsou zásadně a vždy otevřené. Neustále vyměňují s okolím různé formy hmoty a energie. To však vylučuje jednoduché aplikace postupů rovnovážné termodynamiky, které byly odvozeny pro uzavřené a izolované systémy. Na druhé straně, na enzymové reakce ve zkumavce či na kalorimetrické pokusy lze samozřejmě aplikovat všechny vztahy rovnovážné termodynamiky bez jakýchkoli omezení.

Často bývá diskutována platnost základních termodynamických vět v biologii. Zákon o zachování energie (první věta termodynamická) nikdy nebyl v biologii zpochybněn. V biologických systémech, stejně jako v jakýchkoli jiných, energie nevzniká ani se v nich neztrácí, pouze přeměňuje z jednoho druhu na jiný.

O platnosti druhé věty termodynamické v biologických systémech byly často vyslovovány pochybnosti. Změny tlaku a teploty jsou při procesech v živých soustavách ale většinou tak malé a pomalé, že je obvykle nemusíme brát v úvahu. To vysvětluje, proč biochemici používají Gibbsovu energii jako míru chemické energie: hodnota  $\Delta G$  je totiž ekvivalentní množství využitelné (netepelné) energie, kterou může poskytnout reakce probíhající za konstantního tlaku a teploty.  $\Delta G$  lze také chápat jako hodnotu charakterizující „vzdálenost“ reakční směsi od rovnováhy [34].

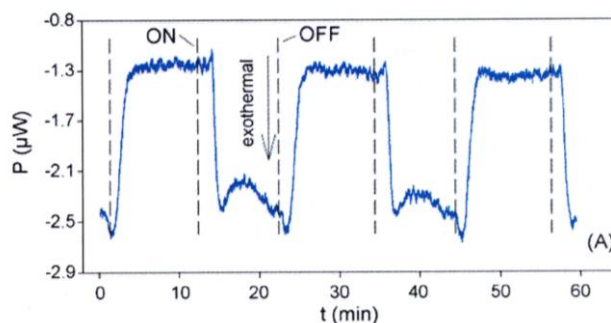
## 1.4.2 Využití mikrok calorimetru v biochemii a mikrobiologii

Metoda je založená na měření entalpie konverze odpovídajícího substrátu katalyzované zkoumaným enzymem. Za účelem získat odezvu v ustáleném stavu jsou preferovány podmínky, při kterých je enzym nasycen substrátem, což je stav, kdy je veškerý enzym vázán ve formě enzym-substrátového komplexu  $ES$  (obr. 18). Toho je možné dosáhnout jen při velkém nadbytku substrátu. Enzymatická reakce pak probíhá limitní rychlostí  $V$ . Zajištěním těchto podmínek se umožní korekce vlivů základní linie (base line) a potlačí se vliv dynamických chyb.



**Obr. 18 Závislost rychlosti enzymatické reakce na koncentraci substrátu [35]**

Experimentálně bylo dokázáno, že vhodně navržené čipové kalorimetry jsou použitelné pro *on-line* detekci metabolické produkce tepla mikroorganismů kultivovaných v bioreaktoru. Touto metodou je možné stanovit růstovou křivku sledované kultury. Během experimentu je aplikován roztok obsahující substrát a výživné látky. Tím buňky zahájí metabolismus (anabolickou fází, reakce je endotermická). Po ukončení aplikace roztoku se signál vrací zpět na referenční hladinu (obr. 19).



**Obr. 19 Kalorimetrické měření metabolické produkce tepla biofilmu *Escherichia coli* [36]**

*ON* znázorňuje aplikaci roztoku s živinami a substrátem, *OFF* konec aplikace

Sledovaná změna produkce tepla znázorňuje míru aktivity bakterií asociovaných na povrchu v podobě biofilmu.

Buňky imobilizované na kalorimetrickém senzoru mohou být užity k *on-line* kontrole změn při čištění odpadních vod či pitné vody.

Mikrokalorimetricky lze stanovit teplo absorpce organických par na tenké polymerové filmy [30, 35-37].

Metoda měření glukózy čipovým mikrokalorimetrem byla úspěšně aplikovaná na popsání reakce hexokinázy (glukóza-6-fosfát dehydrogenázy). Dalším krokem hodnocení mikrokalorimetrie jako potenciálního klinického analytického nástroje bylo zkoumání měření obsahu kyseliny močové s použitím urikázy. Spektrofotometrické stanovení kyseliny močové touto reakcí požaduje vysoce kvalitní UV spektrofotometr, přičemž stále existuje pravděpodobnost, že jistý subjekt interferuje [38].

Dalšími aplikacemi lze zmínit například enzymatické stanovení penicilinu a dalších látek v pufrech, bioreaktorech a také v krvi. Pro enzymatická měření lze pokrýt kalorimetrický čip enzymem [30].

### 1.4.3 Výhody a nevýhody mikrokalorimetrie

Mikrokalorimetrická metoda je kvantitativní, levná a univerzální. Výhoda mikrokalorimetrie spočívá v časové, materiální a finanční úspoře [26, 27]. Kalorimetrie nabízí možnost studovat enzymovou aktivitu bez nutnosti enzymy značit. Důležitou výhodou měření aktivity enzymů pomocí kalorimetru je možnost využití imobilizovaných enzymů. Byl vyvinut speciální typ čipového modulu s vyjímatelnou reakční komorou, aby zajistil snadné zavedení imobilizovaných partikulí [36]. Srovnáním IC-kalorimetru s dobře známými klasickými kalorimetry byly zjištěny významné výhody, jako je malá kapacita aktivního místa držáku vzorku na čipu a velmi malá konstanta tepelné výměny mezi vzorkem a chladičem [39]. Výhodou oproti spektrofotometrii je skutečnost, že kalorimetrie umožňuje kvantifikaci bez nutnosti oddělit ostatní složky reakční směsi. U spektrofotometrie platí, že pokud má produkt reakce stejné absorpční vlastnosti jako substrát, nebo mají-li složky reakční směsi vysoké pozadí, absorbance neodpovídá změnám vyvolaným reakcí. Další výhodou spočívá v možnosti stanovit množství analyzované látky aktuálně přítomné v roztoku bez potřeby analýzy čistého standardu a bez nutnosti předanalytické úpravy vzorku séra. Přesnost měření v séru je srovnatelná s měřeními ve vodných roztocích. Ačkoli je mikrokalorimetrická technika pomalejší, zvláště pokud se jedná o vsádkový kalorimetr, stabilita přístroje a podstata fyzikálních jevů, které se stanovují, nabízí zaručené výhody oproti jiným technikám analýzy [38].

Použití mikrokalorimetrické metody není vhodné, pokud nelze dosáhnout rovnovážného stavu reakce. To může nastat v případě omezené rozpustnosti reaktantů, jako například kyslíku, oxidu uhličitého, či hydrofobických organických sloučenin [39]. Mikrokalorimetrie neposkytuje dostatečnou citlivost měření při použití velkých objemů vzorků nebo v případě analýzy průběhu reakce za dlouhý časový úsek [38].

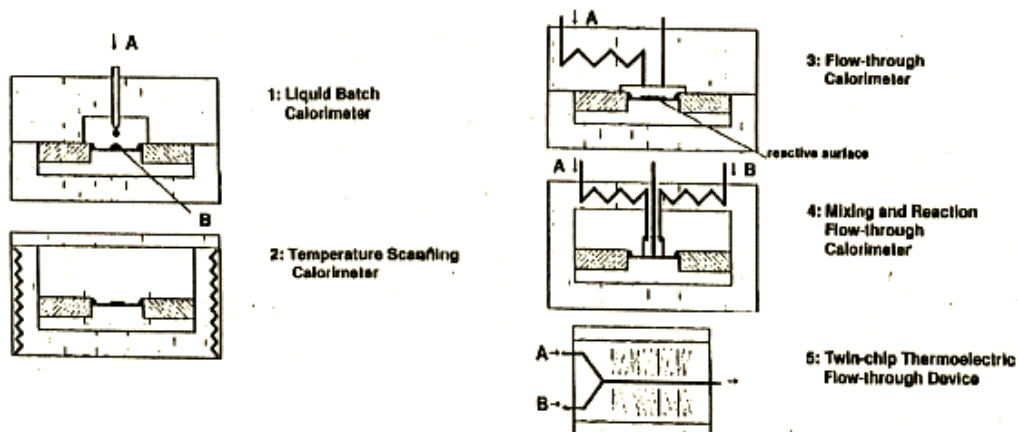
### 1.4.4 IC-kalorimetry

Konstrukce kalorimetru (prvky jako termistor, termočlánek a kalibrační ohříváč, které jsou zakomponovány díky moderním technologiím v křemíkové membráně čipu) vede k nejčastěji používanému označení IC-kalorimetr (IC=*integrated circuit*) [26].

Typy IC kalorimetrů (obr. 20) [39]:

- a) Nejjednodušejší sestavitelný je vsádkový kalorimetr. Vzorek je umístěn v aktivním místě termočláneku a reakce může být iniciována aplikací kapky druhé komponenty na vzorek.
- b) Kalorimetr s měrnou a referenční plochou čipu, který umožňuje plynule měnit teplotu v kalorimetru.
- c) Průtokový kalorimetr: Lze jej použít při studiu interakcí mezi pevnou a plynnou fází a sledovat tepelnou produkci enzymaticky katalyzovaných reakcí. Enzym je možné imobilizovat na povrchu čipu a roztok obsahující substrát kontinuálně protéká kolem čipu pokrytého enzymem.
- d) Směšovací průtokový kalorimetr: Zavedením přídavného přívodného kanálu a tepelného zaizolování aktivní oblasti na povrchu čipu, kde dochází ke směšování

komponent, vzniká z jednoduchého průtokového kalorimetru směšovací kalorimetr vhodný pro sledování reakcí kapalných komponent.



Obr. 20 Schematické znázornění konstrukčně odlišných IC kalorimetrů [39]

*A, B znázorňují roztoky s reaktivními komponentami*

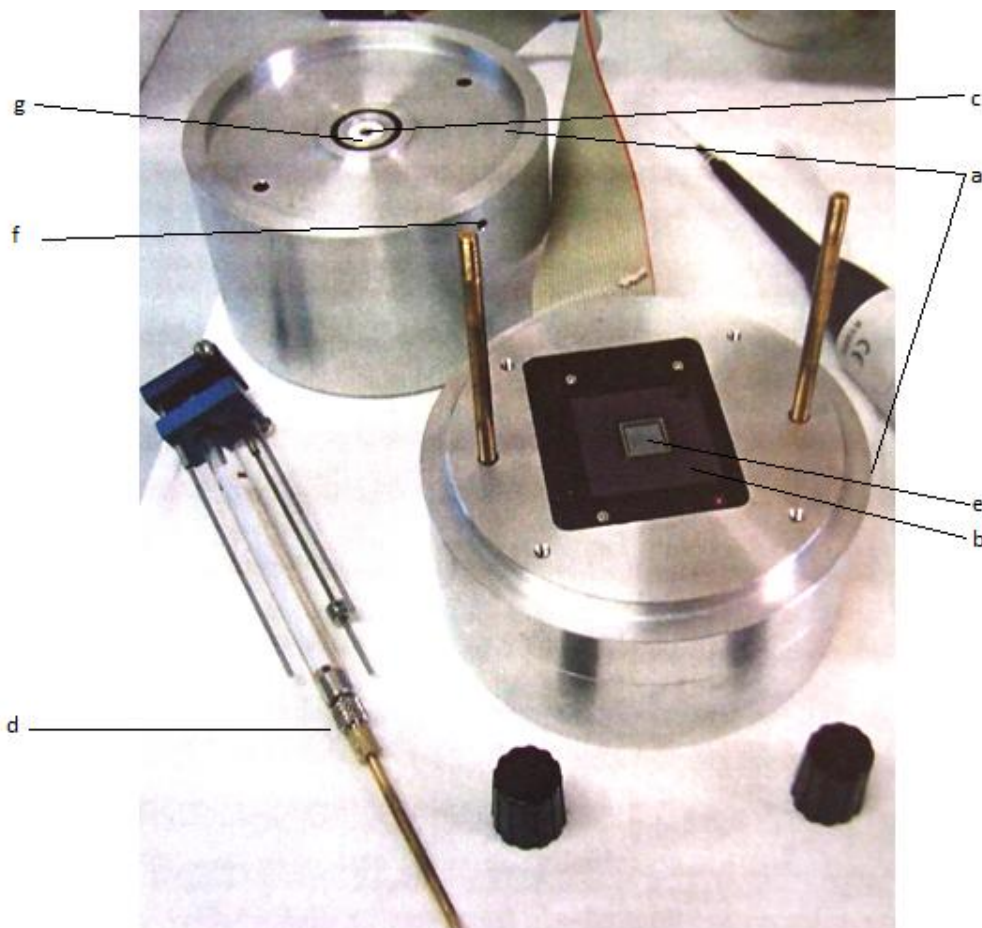
Podle doporučení IUPAC by měl být kalorimetr použitý v diplomové práci nazýván jako „izotermní mikrokolorimetr“ vzhledem k účelu, k jakému byl vyvinut, to znamená pro měření v rozsahu mikrowatů. Termín izotermní zde není použit v pravém slova smyslu, ale značí především to, že teplota v kalorimetru je konstantní. S ohledem na princip měření je častější označení „kalorimetr s tepelným tokem“. Jelikož je změna teploty velmi malá, je možné zařadit kalorimetr do skupiny takzvaných „quasi-izotermních“ kalorimetrů s tepelným tokem.

IC-kolorimetr použitý k experimentům v této diplomové práci se skládá ze dvou podélně spojených válcovitých hliníkových bloků (a) o průměru 10 cm (obr. 21). Čip je umístěn v centru celého uspořádání. Keramický nosič čipu (b) je tepelně propojen se spodním hliníkovým válcem pomocí kovových spon. Otvor (c) v ose horního válce slouží pro zavedení mikrostříkačky (d), která obsahuje reakční komponentu přidávanou k té, která se nachází na membráně čipu (e). Při zasouvání mikrostříkačky do víka, resp. uzavřeného kalorimetru, by docházelo k přetlaku v reakční komoře. K jeho eliminaci slouží boční kanálek (f) pro odvod par. Zvlhčovací kroužek (g), připevněný zevnitř na horní část kalorimetru, je nezbytný pro rychlejší vyrovnání tlaku par. To snižuje rychlost vypařování kapalných vzorků umístěných na povrch křemíkové membrány čipu, a proto vede k rychlejší stabilizaci signálu.

Plocha, na kterou se kapka nebo pevná látka umísťuje, se nazývá aktivní oblast. Teplotní gradient snímaný pomocí termočlánků v aktivní oblasti je převeden na výstupní signál napětí v  $\mu\text{V}$ . Entalpii reakce  $\Delta H_r$  při dané teplotě lze vypočítat z plochy píku A, citlivosti čipu S a počtu molů  $n$  reagující látky pomocí vztahu:

$$\Delta H_r = \frac{A}{S \cdot n} \quad /25/$$

Citlivost čipu lze zjistit elektrickou nebo chemickou kalibrací.



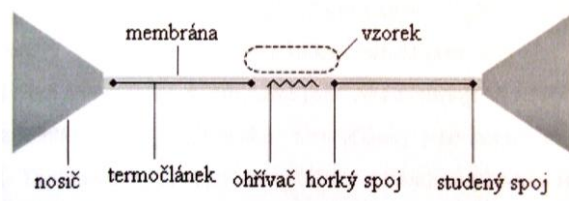
**Obr. 21 Fotografie IC-kalorimetru [26]**

*Popisky k obrázku jsou uvedeny v textu*

Studium termodynamických vlastností vzorků pomocí IC-kalorimetru lze provádět pro různé teploty v rozmezí 20-45 °C. Teplotu lze volit pomocí temperovaného boxu, ve kterém je kalorimetr umístěn. To je obzvláště výhodné při studiu enzymatických reakcí pro simulaci tělesné teploty 37 °C [26].

### Čip NCM-9924

Čip NCM-9924 je konstruován pomocí technologií, která umožňuje vznik struktury na bázi křemíku. Plní tři funkce: funkci ohříváče, senzoru teploty a „držáku vzorku“ (obr. 22).



**Obr. 22 Schéma čipu s termočlánsky a ohříváči [26]**

Čip se skládá z 8,3×8,3 mm velké membrány z monokrystalického křemíku uchycené do keramického rámu. S okraji nutnými pro uchycení membrány k rámu činí celková plocha

membrány 10×10 mm. Tloušťka membrány je 22-45 μm s citlivostí přibližně 2,4 nebo 1,2 V·W<sup>-1</sup>. Uprostřed membrány se nachází tzv. citlivá oblast, nazývaná také jako aktivní oblast. Aktivní oblast je 4×4 mm velká a obsahuje tři odporové ohříváče a termočlánky. Pouze v této oblasti dochází ke snímání teplotního rozdílu vyvolaného mísením kapek a následnou reakcí komponent. Dva odporové ohříváče jsou vyrobeny z hliníku a třetí z křemíku. Termočlánky jsou integrovány mezi ohříváč a keramický rám. Teplotní rozdíl termočlánky snímají a převádí na výstupní signál. K porovnání teplot dochází mezi středem membrány (aktivní oblastí) a teplotou keramického rámu.

Předností tohoto čipu oproti podobným čipům (například LCM-quad) je mechanická odolnost daná tloušťkou jeho membrány. Tenkostí membrány je dosaženo nízkého tepelného odporu, což je výhodné pro kapalně aplikace [26].

### 1.4.5 Kalibrace mikrokolorimetru

Většina izotermních kalorimetrů je kalibrována dodáním tepla pomocí elektrického ohřevu. Elektrický ohříváč bývá umístěn v kalorimetrické nádobce, případně je v IC-kalorimetru integrován v křemíkové membráně. Elektrická kalibrace je méně vhodná z hlediska zohlednění procesů proudění tepla během reakce. To může vést k závažným chybám a v tomto případě je vhodnější použití chemické kalibrace. Bez ohledu na zvolenou techniku je nutné ověřit celkový výkon zařízení [26].

#### Elektrická kalibrace

Miniaturizací kalorimetru vznikají nové problémy s ohledem na citlivost a přesnost měření. Při posuzování výsledků je nezbytné přesné stanovení uvolněného nebo spotřebovaného tepla. Toto stanovení však může být ovlivněno řadou nežádoucích faktorů jako je odpařování, míchání nebo proudění. Všechny uvedené faktory ovlivňují také kalibraci kalorimetru a tvoří systematické chyby měření.

Elektrická kalibrace je založena na stanovení citlivosti nebo kalibrační konstanty kalorimetru. Citlivost čipu se získá porovnáním výstupního signálu  $U$  (μV) s teplem dodaným pomocí odporového ohříváče ve formě příkonu  $P$  (mW). Kalibrační konstanta, dále jen citlivost, je stanovena pomocí vztahu:

$$S[V \cdot W^{-1}] = \frac{U}{P} \quad /26/$$

V literatuře je u elektrické kalibrace izotermních mikrokolorimetrů uváděna chyba měření až 5 % [26].

#### Chemická kalibrace

Elektrický kalibrační ohříváč může vést k podstatně odlišnému rozložení teploty v reakční nádobě resp. aktivní oblasti membrány nebo způsobit jiné tepelné proudění ve srovnání se

zkoumanou reakcí. V těchto případech je vhodné provést srovnání chemickou kalibrací. Chemická kalibrace se provádí vhodně zvolenou kalibrační reakcí. V této práci byly zvoleny reakce tris(hydroxymethyl)aminomethanu s kyselinou chlorovodíkovou a kyseliny chlorovodíkové s hydroxidem sodným.

Citlivost čipu se vypočítá ze směrnice přímky  $k(x)$  závislosti plochy píku  $A$  na koncentraci látky použité při kalibraci, podle vztahu:

$$S = \frac{k(x)}{\Delta H_r^{25^\circ\text{C}} \cdot V} \quad /27/$$

V tomto vztahu odpovídá  $k(x)$  směrnici přímky dané závislostí plochy píku proběhlé reakce na koncentraci HCl případně NaOH.

Hodnoty entalpií reakce  $\Delta H_r$  tris(hydroxymethyl)aminomethanu s kyselinou chlorovodíkovou pro různé teploty jsou uvedeny v tab. 1. Hodnota entalpie reakce kyseliny chlorovodíkové s hydroxidem sodným při 25 °C je -58 kJ·mol<sup>-1</sup>.

**Tab. 1** Hodnoty entalpií reakce  $\Delta H_r$  tris(hydroxymethyl)aminomethanu s HCl pro různé teploty

T (°C)	$\Delta H_r$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )
15	48,22
20	47,84
25	47,44
30	47,11

Citlivost čipu a faktory ovlivňující její hodnotu jsou jedny z hlavních parametrů studovaných v dizertační práci Podzemné [26].

## 1.4.6 Faktory ovlivňující citlivost čipu

V této kapitole bude shrnuto několik experimentálně získaných poznatků Podzemné [26], která pracovala s výše popsaným IC-kalorimetrem s čipem NCM-9924. Faktory ovlivňující citlivost čipu byly studovány pomocí elektrické kalibrace.

### Tloušťka membrány

Bylo dokázáno, že mezi citlivostí a tloušťkou membrány platí nepřímá úměra. Tedy čím silnější membrána, tím se citlivost čipu bude více přibližovat spodní hranici rozmezí citlivosti uvedeného v literatuře [40].

### Teplota

Měření Podzemné [26] dokazují, že s rostoucí teplotou se citlivost čipu snižuje. Při změně teploty v řádech desetinách stupňů lze pokládat tento vliv za nevýznamný. Při změnách teploty o 5 °C je změna citlivosti čipu významná.

### Objem kapaliny na čipu

Objem kapaliny na čipu je limitován rozměry aktivní oblasti membrány 4×4 mm. Při měření je důležité počítat s celkovým objemem po přidání druhé reakční komponenty. Po přesáhnutí



aktivní oblasti dochází ke zkreslení tepelného zabarvení reakce. Se vzrůstajícím objemem kapaliny na povrchu membrány citlivost čipu klesá.

#### **Temperační doba**

Temperační doba je čas potřebný k ustálení teploty a tím i signálu. K ustálení hodnot základní linie k nule nedochází ihned po zahájení měření. Teplotní podmínky závisí nejen na vyrovnání teploty uvnitř kalorimetru a vzorku na čipu, ale také na tlaku par v reakční komoře. Bylo prokázáno, že chyba měření výrazně klesá při době ustalování minimálně 20 min u běžných reakcí a 40-50 min u enzymatických reakcí.

#### **Tlak par v reakční komoře**

K minimalizaci vypařování vzorku a zajištění konstantního tlaku par slouží kroužek z filtračního papíru umístěný na spodní části víka hliníkového boxu. Sérií měření bylo určeno, že minimální rozdíl v citlivosti je při použití objemu 6 a 8  $\mu$ l pro navlhčení kroužku.

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Použité chemikálie

*Tab. 2 Seznam použitých chemikálií*

Chemikálie	Čistota	Označení	Dodavatel
Kyselina chlorovodíková	35% p.a.	ES <sup>1</sup> 231-5595-7	LACH-NER
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Ultrapure	ES 201-064-4	PENTA
N,N-dimethylformamid	Pure	ES 200-679-5	LACH-NER
Chlorid vápenatý			
<i>Enzym</i>			
Trypsin (z hovězího pankreatu)		EC <sup>2</sup> 232-650-8	ALDRICH
<i>Substrát</i>			
N $\alpha$ -benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid hydrochlorid		ES 244-505-6	ALDRICH

<sup>1</sup> ES, EINECS-„European INventory of Existing Commercial chemical Substances“ evropský seznam existujících obchodovatelných chemických látek, umožňuje nalézt obecné informace o chemických látkách.

EC-„Enzyme Commission“ systém číselné klasifikace enzymů

Dále jsou uvedeny základní charakteristiky látek tak, jak je uvádí dodavatel (Sigma Aldrich, [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

#### **Hovězí trypsin**

Enzymové číslo: 3.4.21.4

Molekulární hmotnost 23,3 kDa

Koeficient extinkce (vyjadřuje, jak silně daná látka absorbuje záření při dané vlnové délce, v Lambert-Beerově zákoně mu odpovídá hodnota  $\epsilon$ ) = 12,9-15,4 (při 280 nm).

pI: 10,1-10,5

Optimální pH pro aktivitu trypsinu je 7-9 [22, 41, 42].

Metody analýzy: Pro trávicí proteiny je doporučován poměr mezi enzymem a substrátem mezi 1:100 až 1:20 (w/w) [43].

### **N $\alpha$ -Benzoyl-L-arginin 4-nitroanilid hydrochlorid (BApNA)**

BApNA je chromogenní substrát pro trypsin a další proteolytické enzymy.

Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>·HCl

Molekulová hmotnost: 434,88 g/mol [44]

Používání syntetických látek jako substrátů enzymů zjednodušilo proces stanovování enzymatické aktivity. V odborných člancích je sledována enzymatická aktivita trypsinu a to metodami spektrofotometrickou [19, 45, 46] nebo fluorescenční (při použití fluoreskujících specifických substrátů, jako např. Z-Arg-AMC či dimer procyanidinu B3). Chromogenní substráty serinových proteáz zahrnují p-nitroanilidy a p-nitrofenyl estery volných nebo N-acylovaných aminokyselin a peptidů [47-49] aj. Substrátem použitým v diplomové práci je N $\alpha$ -bezoyl-L-arginin-p-nitroanilid hydrochlorid. Tento substrát je dobře rozpustný ve vodných roztocích, stabilní v nepřítomnosti enzymu, citlivý a specifický pro trypsin a schopný se hydrolyticky štěpit, proto splňuje kritéria pro vhodný substrát.

## **2.2 Zařízení a příslušenství**

IC-kalorimetr (TU Bergakademie Freiberg, Německo)

Čip NCM-9924 (Xensor Integration, Delft, Nizozemí)

Incubátor S160D (Bibby Scientific Ltd, Velká Británie)

BioPhotometer plus 230 V/50-60 Hz (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)

Hellma TrayCell (Hellma GmbH & Co. KG)

Víčko pro TrayCell, délka optické dráhy 1 mm (Hellma GmbH & Co. KG)

Záložní zdroj APC Smart UPS RT (American Power Conversion Corp., Velká Británie)

Počítač pro zpracování dat (Intel® Celeron™ CPU, RAM 261 616 kB, HDD 20 GB)

Mraznička EUF 10003W (Electrolux, Švédsko)

Analytické váhy (Kern, Německo)

pH-metr (Inolab, Česká republika)

Mikropipety Biohit 1-10  $\mu$ l; 100-1000  $\mu$ l

Mikrostříkačka Hamilton 1-5  $\mu$ l

Běžné laboratorní nádobí

## 2.3 Pracovní postupy

### 2.3.1 Elektrická kalibrace

Při elektrické kalibraci se aplikovalo 8  $\mu\text{l}$  redestilované vody na aktivní oblast membrány. Kroužek filtračního papíru nalepený na spodní části víka hliníkového bloku byl navlhčen 8  $\mu\text{l}$  redestilované vody. Kalorimetr se uzavřel a do víka se zasunula prázdná mikrostříkačka. V programu MATLAB se nastavila hodnota příkonu 0,1 mW, doba ohřevu 150 s a celková doba jednoho cyklu 300 s.

### 2.3.2 Chemická kalibrace

Pro chemickou kalibraci byla použita reakce tris(hydroxymethyl)aminomethanu s kyselinou chlorovodíkovou a hydroxid sodného s kyselinou chlorovodíkovou.

Pro první kalibrační reakci se na aktivní oblast čipu umístily 3  $\mu\text{l}$  kyseliny chlorovodíkové o koncentracích 0 mol/l; 0,025 mol/l; 0,05 mol/l. Kroužek z filtračního papíru se navlhčil 8  $\mu\text{l}$  redestilované vody a kalorimetr se uzavřel. Do víka se zasunula Hamiltonova mikrostříkačka s 4,4  $\mu\text{l}$  roztoku tris(hydroxymethyl)aminomethanu o koncentraci 0,1 mol/l. Po ustálení teplotní rovnováhy (20-30 min) se reakce spustila stlačením mikrostříkačky. Reakci bylo možné ukončit po 10 min od vyprázdnění mikrostříkačky. Bylo provedeno 5 měření pro jednotlivé koncentrace kyseliny chlorovodíkové.

Při druhé kalibrační reakci se na aktivní oblast čipu umístily 3  $\mu\text{l}$  kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,1 mol/l. Kroužek z filtračního papíru se navlhčil 8  $\mu\text{l}$  redestilované vody a kalorimetr se uzavřel. Do víka se zasunula Hamiltonova mikrostříkačka s 4,4  $\mu\text{l}$  roztoku hydroxid sodného o koncentracích 3 mmol/l; 4 mmol/l; 7 mmol/l. Po ustálení teplotní rovnováhy (20-30 min) se reakce spustila stlačením mikrostříkačky. Reakci bylo možné ukončit po 10 min od vyprázdnění mikrostříkačky. Bylo provedeno 5 měření pro jednotlivé koncentrace hydroxid sodného.

### 2.3.3 Studium kinetiky reakcí pomocí mikrokolorimetru

Celkový objem reakční směsi na čipu po vyprázdnění mikrostříkačky nemá překročit 12  $\mu\text{l}$ . Jedním z kritérií pro stanovení vhodného objemu reakční směsi je hranice aktivní oblasti čipu 4 $\times$ 4 cm. Tento objem závisí na smáčivosti povrchu membrány.

Mezi jednotlivými měřeními bylo důležité dokonalé promytí mikrostříkačky redestilovanou vodou, protože po nedokonalém odmytí nečistot v mikrostříkačce se objevily rušivé vlivy na měření.

Pufř byl připravován jednou týdně smícháním anorganického pufru TRIS-HCl+CaCl<sub>2</sub> o koncentraci 0,1 mol/l a pH=7,8 s N,N-dimethylformamidem v poměru 1:1. Složení použitého anorganického pufru: 0,1 mol/l Tris(hydroxymetyl)aminometan+0,1 mol/l HCl

+0,025 mol/l CaCl<sub>2</sub>, pH=7,8. Hodnota pH pufru byla ověřena pH metrem. Reakce byly zkoumány při teplotě 25 °C. Enzym trypsin i substrát BApNA byly uchovány podle doporučení dodavatele při -20 °C. Roztoky enzymu i substrátu byly připravovány každý den čerstvé. V průběhu měření byly vzorky enzymu a substrátu uchovány v ependorfkách zabalených do alobalu kvůli citlivosti N,N-dimethylformamidu na světlo.

### **Vliv koncentrace enzymu na kinetiku enzymatické reakce**

Byly provedeny dvě série měření pro různé poměry  $n_E:n_S$ . V první sérii měření bylo v 1 ml pufru rozpuštěno 2,70; 5,01; 7,71 a 10,28 mg enzymu trypsinu. Roztok substrátu N $\alpha$ -Benzoyl-L-arginin4-nitroanilid hydrochloridu o koncentraci 0,054 mol/l byl připraven rozpuštěním pevné látky v pufru o stejném složení, v jakém byl rozpuštěn enzym. V druhé sérii měření bylo v 1 ml pufru rozpuštěno 4,06; 6,40; 9,00; 11,20 mg enzymu trypsinu. Roztok substrátu N $\alpha$ -Benzoyl-L-arginin4-nitroanilid hydrochloridu o koncentraci 0,025 mol/l byl připraven rozpuštěním pevné látky v pufru o stejném složení, v jakém byl rozpuštěn enzym.

Na čip byly napipetovány 3  $\mu$ l roztoku substrátu BApNA o koncentraci 0,054 mol/l (resp. 0,025 mol/l) a kroužek byl navlhčen 8  $\mu$ l roztoku substrátu. Hamiltonova mikrostříkačka byla naplněna 4,4  $\mu$ l roztoku enzymu o příslušné koncentraci. Rovnováha byla ustálena po 40-50 min. Poté byla reakce spuštěna vyprázdněním mikrostříkačky. Reakce byla zastavena po 10 min. Po odklopení víka bylo možné pozorovat žluté zabarvení kapky díky vzniklému produktu. Pro jednotlivé koncentrace enzymu bylo provedeno 5 měření.

### **Vliv koncentrace substrátu na kinetiku enzymatické reakce**

Byly provedeny dvě série měření pro různé poměry  $n_E:n_S$ . V první sérii měření bylo v 1 ml pufru rozpuštěno 2,61 mg enzymu trypsinu. Roztok substrátu BApNA byl připraven o různých koncentracích v intervalu 0,020-0,079 mol/l rozpuštěním pevné látky v pufru o stejném složení, v jakém byl rozpuštěn enzym. V druhé sérii měření bylo v 1 ml pufru rozpuštěno 9,00 mg enzymu trypsinu. Roztok substrátu BApNA byl připraven o různých koncentracích v intervalu 0,039-0,076 mol/l rozpuštěním pevné látky v pufru o stejném složení, v jakém byl rozpuštěn enzym.

Na čip byly napipetovány 3  $\mu$ l roztoku substrátu BApNA o příslušné koncentraci. Rovnováha byla ustanovena po 40-50 min. Následně byla reakce spuštěna vyprázdněním mikrostříkačky. Reakce byla zastavena po 10 min. Po odklopení víka bylo možné pozorovat žluté zabarvení kapky díky vzniklému produktu. Pro jednotlivé koncentrace substrátu bylo provedeno 5 měření.

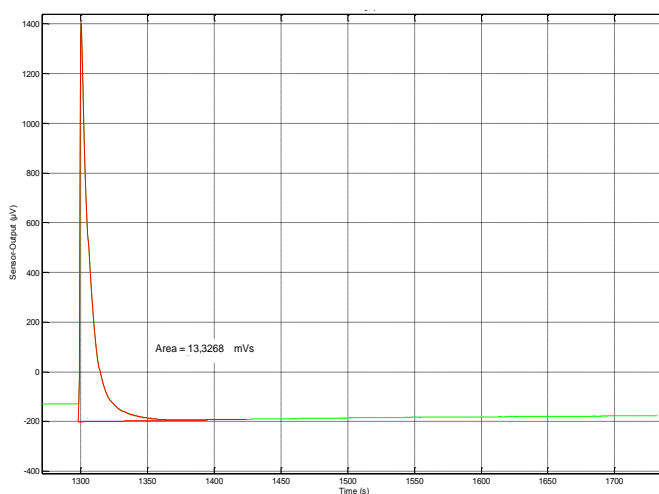
### 2.3.4 Studium kinetiky reakcí pomocí BioPhotometeru plus

Vzorky byly připraveny identicky jako u kalorimetrických stanovení za účelem porovnání výsledků měření obou metod. Pro měření s použitím víčka 1 mm je doporučený objem vzorku mezi 3-5  $\mu\text{l}$ . Toto omezení přístroje se vyřešilo snížením celkového objemu reakční směsi enzymu a substrátu z objemu 7,4  $\mu\text{l}$  (konečný objem reakční směsi při reakci na čipu) na 5  $\mu\text{l}$  při zachování poměru látkových množství enzymu a substrátu. Pro co nejpřesnější simulaci reakce na čipu se na okénko (e) na kyvetě pipetovalo 2,03  $\mu\text{l}$  substrátu a následně 2,97  $\mu\text{l}$  enzymu (obr. 12). Na kyvetu se umístilo víčko a spustilo se měření. Jako blank byla použita směs anorganického pufru a N,N-dimethylformamidu v poměru 1:1.

BioPhotometer plus je limitován maximální měřitelnou absorbancí rovnou třem. Při absorbancích vyšších jak tři nelze signál vyhodnotit. Tento problém se vyřešil větším ředěním vzorku při zachování poměru látkových množství enzymu a substrátu. Do ependorfky byly pipetovány 3  $\mu\text{l}$  substrátu a 4,4  $\mu\text{l}$  enzymu a reakční směs byla doplněna do 100  $\mu\text{l}$  směsí anorganického pufru a N,N-dimethylformamidu v poměru 1:1. Z tohoto roztoku bylo pipetováno 5  $\mu\text{l}$  na okénko kyvetu. Na kyvetu se umístilo víčko a spustilo se měření.

## 2.4 Vyhodnocení výsledků

Během experimentu s použitím mikrokalorimetru je změna teploty v průběhu reakce snímána termočlánkem a zaznamenána ve formě napětí. Plocha pod křivkou závislosti  $U=f(t)$  je přímo úměrná reakčnímu teplu podle vztahu /25/. Na obr. 23 je uvedena křivka pro reakci kyseliny chlorovodíkové s tris(hydroxymethyl)-aminomethanem a je zde znázorněno vyhodnocení plochy píku – pik zezdola ohraničíme přímkou, která vychází ze závislosti napětí na čase za efektem.



Obr. 23 Ukázka vyhodnocení plochy píku pro reakci HCl a tris(hydroxymethyl)-aminomethanu

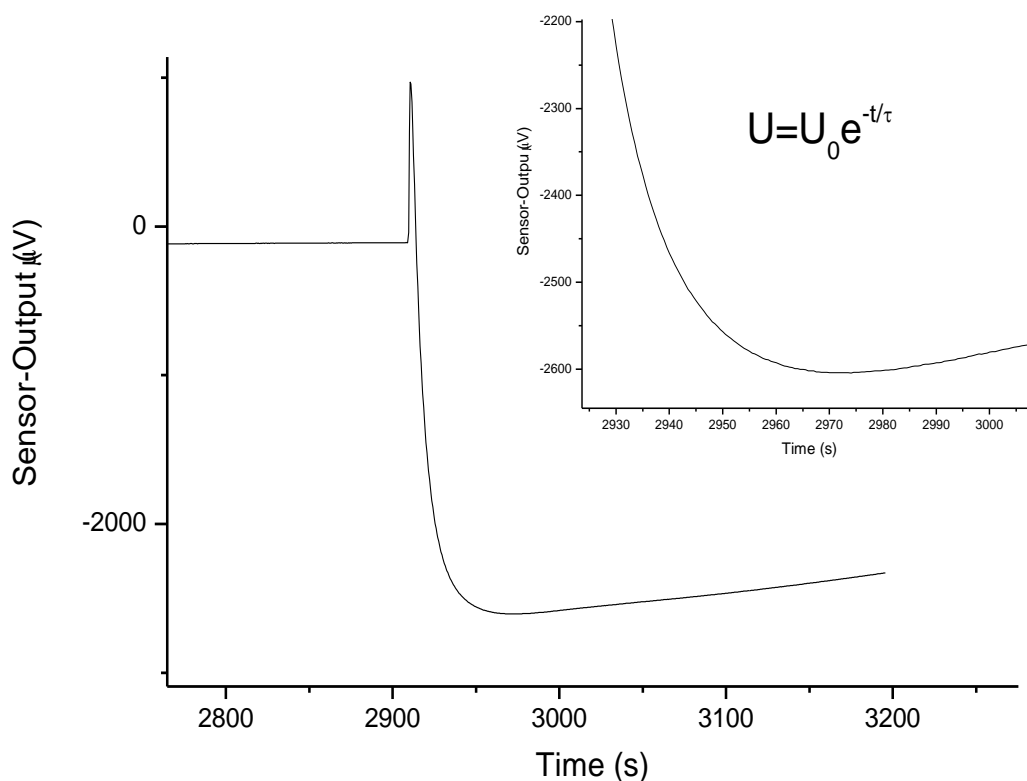
Pro vyhodnocení kinetických parametrů enzymatických reakcí existují dva způsoby.

První pomocí počítačového programu MATLAB/SIMULINK umožňuje modelovat celou křivku závislosti  $U=f(t)$  prostřednictvím nelineární optimalizace vybraných simulačních parametrů. To ovšem vyžaduje podrobné znalosti o reakčním mechanismu, především o možných následných reakcích. Proto je tato metoda považována za méně vhodnou [26].

Druhá varianta stanovení kinetických parametrů je založená na modelování sestupné části křivky závislosti  $U=f(t)$ , jak je znázorněno na obr. 24 a ve vztahu:

$$v_i = \frac{V \cdot c_{sub}}{K_m + c_{sub}} \quad /28/$$

kde  $V$  a  $K_m$  jsou konstanty, za jejichž poměr může být dosazena nová konstanta  $K$ . Její hodnotu lze získat z inverzní hodnoty časové konstanty kalorimetru  $\tau$ . Při modelování této části křivky je možné zanedbat vliv následných reakcí. Hlavními výhodami této metody je snadná manipulace a aplikovatelnost na různé reakce [26].



**Obr. 24 Ukázka vyhodnocení entalpie reakce a časové konstanty kalorimetru pro výpočet kinetických parametrů**

*Vložený obrázek je detail sestupné části křivky*

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem práce bylo navázat na studium enzymatických reakcí Podzemné [26], jehož výsledky shrnula ve své disertační práci. V její práci byly sledovány vlivy některých experimentálních podmínek na výslednou odezvu mikrokalorimetru, případně na výsledky enzymatických reakcí. V této diplomové práci jsou sledovány hlavně vlivy koncentrace enzymu či substrátu na kalorimetrickou odezvu. Dalším záměrem této práce bylo porovnat mikrokalorimetrická měření enzymatické reakce s měřením spektrofotometrickým, pokud možno za stejných podmínek, tj. jak koncentrací, tak i množství jednotlivých složek.

Tepelné signály poskytují o bioprocesech informace v reálném čase. Praktickou výhodou měření reakčního tepla je skutečnost, že oproti jiným biochemickým detektorům mohou být tepelné převodníky namontovány způsobem, který zabraňuje znečištění, čímž se minimalizuje chyba měření. Kalorimetrie pracuje v opticky neprůhledných roztocích a nevyžaduje značení reaktantů [30].

Studium kinetiky enzymatických reakcí je nástrojem pro stanovení enzymatické aktivity. Kinetická data spolu s informacemi o enzymové struktuře mohou poskytnout důležitý klíč ke stanovení biologické funkce enzymů a mohou přispět k návržení způsobu modifikace enzymu pro terapeutické účely. Experimenty v oblasti kinetiky enzymů jsou mimo jiné důležitou stránkou při vývoji nových léků [47-49].

Metoda mikrokalorimetrie má mnohé využití. Díky vysoké citlivosti metody ji lze využívat pro detekci bakteriálních infekcí v tělesných tekutinách a pro screening vlivů farmak, nanočástic, kovových iontů a xenobiotik na metabolismus mikroorganismů, buněk savců a malých živočichů. Je překvapující, že navzdory všem výhodám je kalorimetrie jen zřídka používaná pro sledování a kontrolu bioprocésů u neporušených buněk v laboratoři, průmyslových bioreaktorů nebo ekosystémů [30].

Vzrůstající zájem o trypsin a jeho inhibitory je zapříčiněn jejich výjimečným potenciálem v klinické praxi. Využívají se jako modely protein-proteinových a enzym-substrátových interakcí [49]. Proteázy jsou ve velké míře používány v průmyslu potravinářském, farmaceutickém, kožedělném, hedvábnickém. Využívají se také v pracích prostředcích. Proteázy tvoří 50 % ze všech enzymů, používaných v průmyslu [50, 51]. Studium reakční kinetiky trypsinu získalo význam díky stále rozsáhlejšímu uplatnění trypsinu v klinické praxi například v buněčných kulturách pro výzkum a produkci rekombinantních proteinů, při hojení ran jako perorální léčba zánětlivých otoků, hematomu a bolestí souvisejících s širokou škálou vnitřních a vnějších zranění. Hlavní využití trypsinu spočívá v jeho použití v oblasti proteomiky. Trypsin je studován pro své trávení proteinů před analýzou hmotnostní spektrometrií. Díky vysoké specifické aktivitě trypsinu jsou proteiny natráveny ve velmi krátkém čase, přičemž autolýzou současně vznikají malé fragmenty trypsinu. Tato dvě fakta vedou k vyšší přesnosti analýzy hmotnostním



spektrometrem. Trypsin je významný zprostředkovatel při průmyslové výrobě inzulínu, kde je užíván k pomocnému štěpení zymogenu do aktivní formy inzulínu [49].

V mnoha studiích bylo sledováno, jakým způsobem lze aktivitu trypsinu ovlivnit. Enzymatická aktivita je sledována v oblasti vlivu reakčních podmínek (jako je změna pH nebo teploty) na aktivitu enzymu, dále například v oblasti modifikací enzymu a navázání enzymu do komplexů s polymery [45]. Bylo dokázáno, že acetylace až 70 % aminoskupin trypsinu nezpůsobí omezení enzymatické aktivity, ale výrazně snižuje inhibici trypsinu ovomukoidem (inhibitoru z vaječného bílku). Bylo dokázáno, že přidáním 0,01 mol/l  $\text{Ca}^{2+}$  do reakce dochází k zrychlení reakce o 25 % [52]. Vápenaté ionty jsou specifické pro aktivaci trypsinogenu a studie ukázaly, že vápenaté ionty mohou významně zvýšit katalytickou účinnost serinových proteáz během apoptózy. Je známo, že kationty mají stabilizační efekt na některé ze serinových proteáz, ale mechanismus tohoto vlivu není zatím znám [49]. Výše zmíněné je pouze malým příkladem toho, jakým směrem se výzkum trypsinu ubíral a ubírá.

Dalším významným oborem, kde je podstatné sledování proteináz, je zemědělství. V oblasti blízkého a středního východu se boj se škůdcem *Eurygaster integriceps* chemikáliemi nahrazuje metodami šetrnějšími. Možností je použití nově popsáných inhibitorů hmyzích proteináz, které dokáží vytvořit s trávicími enzymy hmyzu komplexy, které jsou stabilní a těžko disociovatelné. Inaktivací digestivních enzymů dochází k opožděnému vývoji a smrti organismu z nedostatku živin.

V návaznosti na tuto diplomovou práci by bylo užitečné se dále věnovat reakci trypsinu se substráty, podrobněji se zaměřit na mechanismus a studovat kinetiku inhibované reakce, jak je publikováno v literatuře [25, 46], protože výzkum v oblasti syntetických inhibitorů reakcí serinových proteáz má velký význam v oblasti medicíny. Trypsin patří mezi serinové proteázy, jejichž inhibice je považována za významnou v oblasti lékařské chemie k léčbě nemocí, jako je onemocnění agregace destiček, revmatoidní artritidy, pankreatitidy, cystické fibrózy, rozedmy plic a astmatu [53]. Výzkumem bylo dokázáno, že existují deriváty benzylaminu a benzamidinu, které působí jako inhibitory reakcí trypsinu a současně i trombinu [46]. Informovanost o procesech vedoucích k vazbě protein-ligand je zásadní pro navrhování struktury léčiv a v dnešní době je investováno mnoho prostředků do výzkumu a vývoje počítačových metod na prozkoumání procesu vazby enzymu a inhibitoru [53]. Cílem mnoha výzkumníků je získat inhibitory trypsinu z přírodních zdrojů a tyto inhibitory popisovat a srovnávat je s inhibitory synteticky připravenými. Samotné proteázy jsou získávány z živočišných, rostlinných a mikrobiálních zdrojů. Trypsin je převážně izolován z ryb a obojživelníků [48, 50, 51, 54-56].

### 3.1 Kalibrace kalorimetru

V první fázi práce s mikrokolorimetrem je potřeba provést kalibraci a to jak elektrickou tak i chemickou. Elektrická kalibrace probíhá téměř bez vnějšího vlivu, zato při chemické kalibraci se již mohou projevit vlivy (ať už pozitivní nebo negativní) obsluhy a dalších experimentálních podmínek. Při seznamování se s prací na kalorimetru je proto chemická kalibrace vhodným ukazatelem toho, zda již obsluha kalorimetru dosáhla dostatečné zručnosti na provádění reprodukovatelných měření – tj. získané hodnoty ploch píků pro sledovanou reakci budou zatíženy pouze malou chybou (malým rozptylem).

#### 3.1.1 Elektrická kalibrace

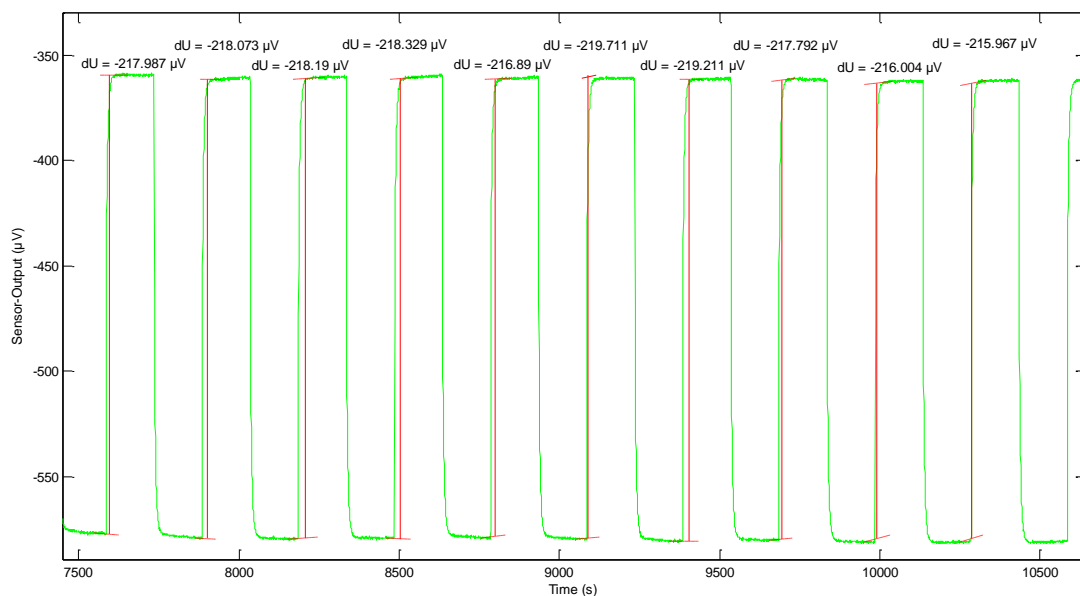
Elektrická kalibrace čipu TA12 byla provedena při 25 °C. Citlivost čipu TA12 byla stanovena porovnáním výstupního signálu (napětí) se vstupním signálem (příkonem) šesti cyklů ohřevu elektrické kalibrace. Pomocí vztahu /26/ lze vypočítat citlivost čipu.

$$S = \frac{-218,29 \cdot 10^{-6}}{-0,0948 \cdot 10^{-3}} V \cdot W^{-1} = 2,30 V \cdot W^{-1}$$

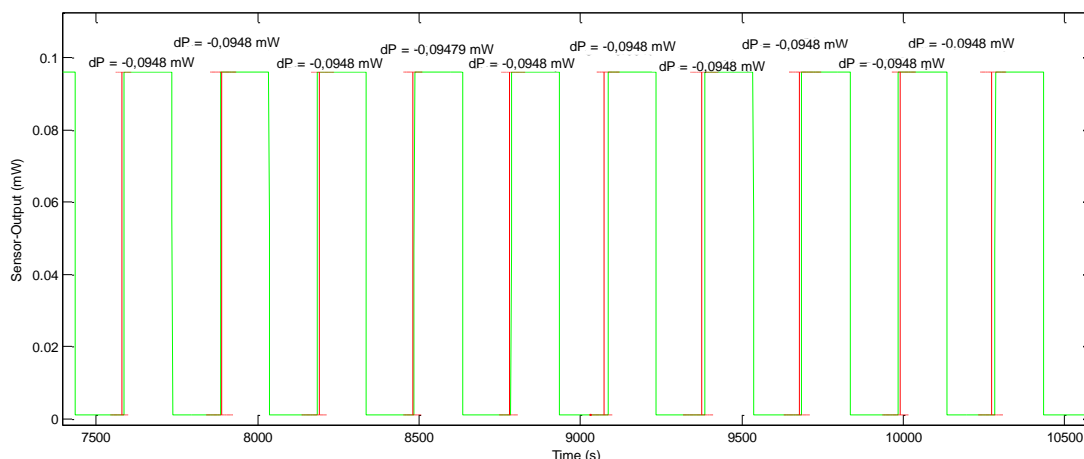
Průběhy časových závislostí vstupního a výstupního signálu jsou znázorněny na obr. 25 a 26. Výsledky měření jsou zahrnuty v tab. 3.

Tab. 3 Výsledky měření elektrické kalibrace

Výstupní signál U (μV)	Vstupní signál P (mW)
-218,29±0,45	-0,0948±0,00
<b>Výsledná citlivost 2,30 V·W<sup>-1</sup></b>	



Obr. 25 Ukázka vyhodnocení cyklů výstupního signálu závislosti  $U=f(t)$



**Obr. 26 Ukázka vyhodnocení cyklů vstupního signálu závislosti  $P=f(t)$**

Práce Podzemné [26] ukazuje na fakt, že chyba stanovení kalibrace při porovnání pěti cyklů ohřevu po zhruba 30 minutách ustálení je stejně velká jako průměr hodnot jednotlivých kalibrací, a je proto možné kalibraci provádět pouze jednou, před každou sérií měření.

Kalibrace je také důležitou informací o aktuálním stavu čipu. Membrána s tloušťkou několik mikrometrů je velmi křehká a vyžaduje opatrnou manipulaci. K jeho závadě však může dojít nejen přímým mechanickým poškozením, ale také opotřebením.

### 3.1.2 Chemická kalibrace

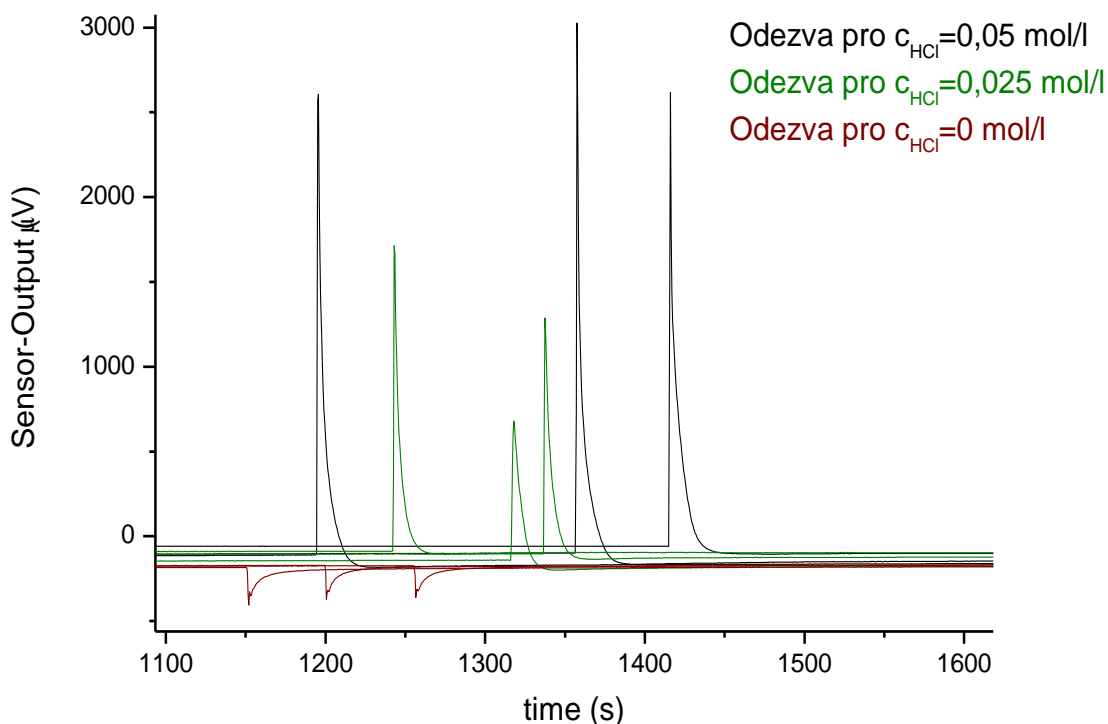
Chemická kalibrace oproti kalibraci elektrické lépe simuluje tepelné proudění při studované reakci. Pro měření byla použita reakce tris(hydroxymethyl)-aminomethanu s kyselinou chlorovodíkovou a reakce hydroxidu sodného s kyselinou chlorovodíkovou.

Způsob stanovení plochy píku znázorňuje obr. 23. Hodnota plochy píku pro jednotlivé koncentrace kyseliny chlorovodíkové při první kalibrační reakci a pro koncentrace hydroxidu sodného při kalibrační reakci druhé byla získána jako průměr hodnot ploch píků pěti měření.

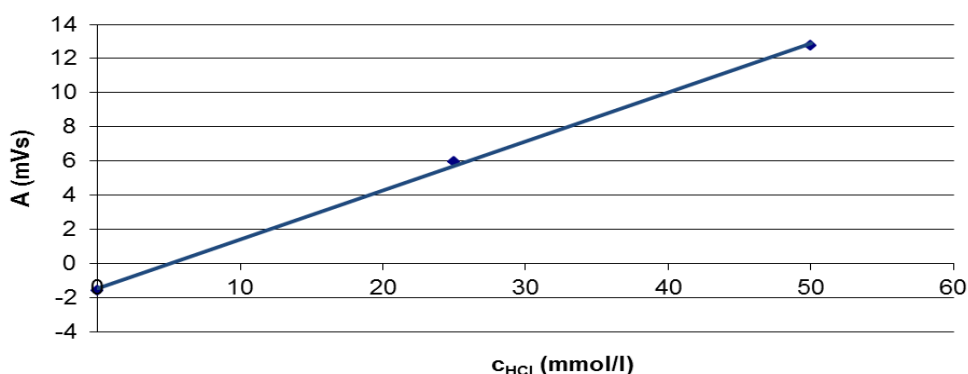
#### Reakce tris(hydroxymethyl)-aminomethanu s kyselinou chlorovodíkovou

Mechanismus reakce:  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2 + \text{H}^+ \rightarrow (\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_3^+$

Ukázka výstupního signálu této reakce je znázorněna na obr. 27, kde jsou pro uvedené koncentrace HCl ukázána vždy tři různá měření. Časová osa na obr. 27 je ponechána tak, jak byl proveden experiment – linie před píkem znamená ustálování teploty před spuštěním reakce; začátek píku odpovídá vyprázdnění Hamiltonovy stříkačky, tj. začátek reakce; linie za píkem je ustálení signálu po reakci.



Obr. 27 Ukázka průběhu výstupního signálu napětí při chemické kalibraci v závislosti na koncentraci kyseliny chlorovodíkové při konstantní koncentraci tris(hydroxymethyl)-aminomethanu



Obr. 28 Chemická kalibrace

Závislost plochy píku na koncentraci kyseliny chlorovodíkové pro reakci  
 $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2 + \text{H}^+ \rightarrow (\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}^{3+}$

Výsledky chemické kalibrace (plochy píků) čipu TA12 pomocí první reakce jsou uvedeny v tab. 4 a zároveň je na obr. 28 vynesena závislost plochy píku na koncentraci HCl. Tato závislost je lineární a rovnice přímky  $A=f(c_{\text{HCl}})$  znázorněné na obr. 28 má podobu  $y=0,2874x-1,4758$ , z čehož lze s použitím směrnice přímky  $k(x)$ , známé hodnoty  $\Delta H_r^{25^\circ\text{C}}$  v tab. 1 a vztahu /27/ dopočítat citlivost čipu.

$$S = \frac{0,2874}{47440 \cdot 0,000003} \text{ V} \cdot \text{W}^{-1} = 2,02 \text{ V} \cdot \text{W}^{-1}$$

Tab. 4 Výsledky vyhodnocení první chemické kalibrace čipu TA12

$c_{\text{HCl}}$ (mmol/l)	A (mVs)
0	-1,59±0,05
25	5,93±0,23
50	12,79±0,12
<b>Citlivost čipu TA12 (<math>V \cdot W^{-1}</math>)</b>	<b>2,02</b>

Citlivost čipu T12 byla první reakcí chemické kalibrace stanovena na  $2,02 V \cdot W^{-1}$ .

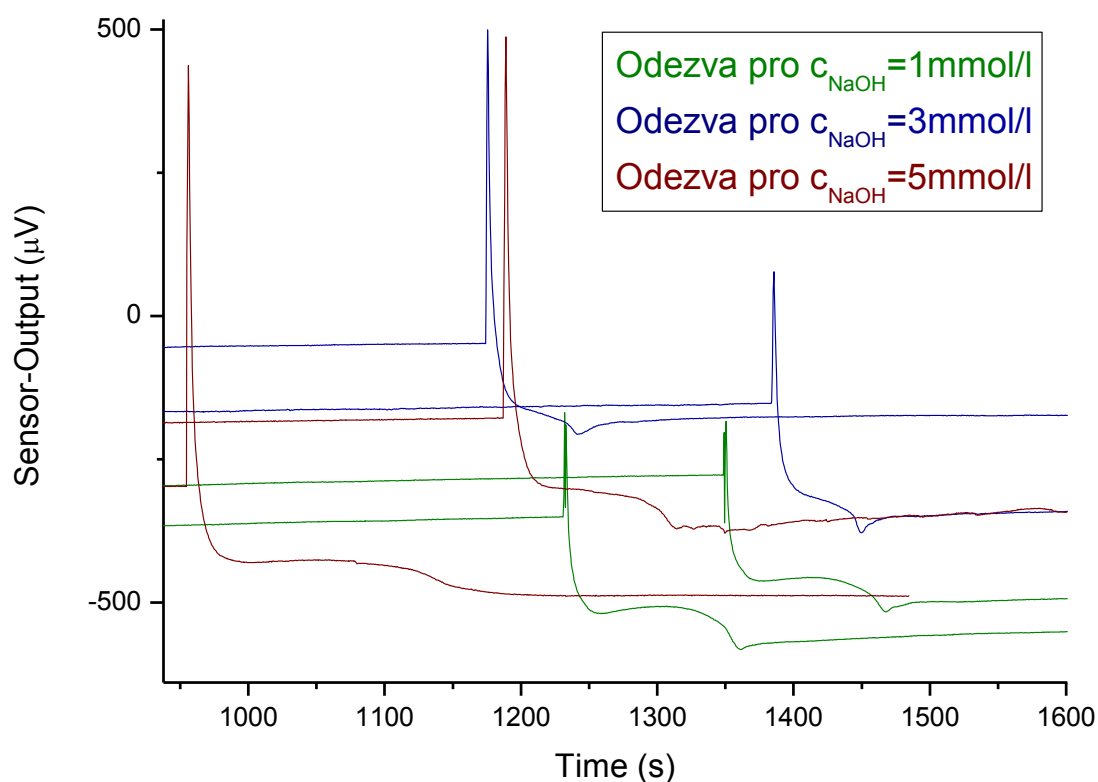
### Reakce hydroxidu sodného s kyselinou chlorovodíkovou

Mechanismus reakce:  $\text{NaOH} + \text{HCl} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{NaCl}$

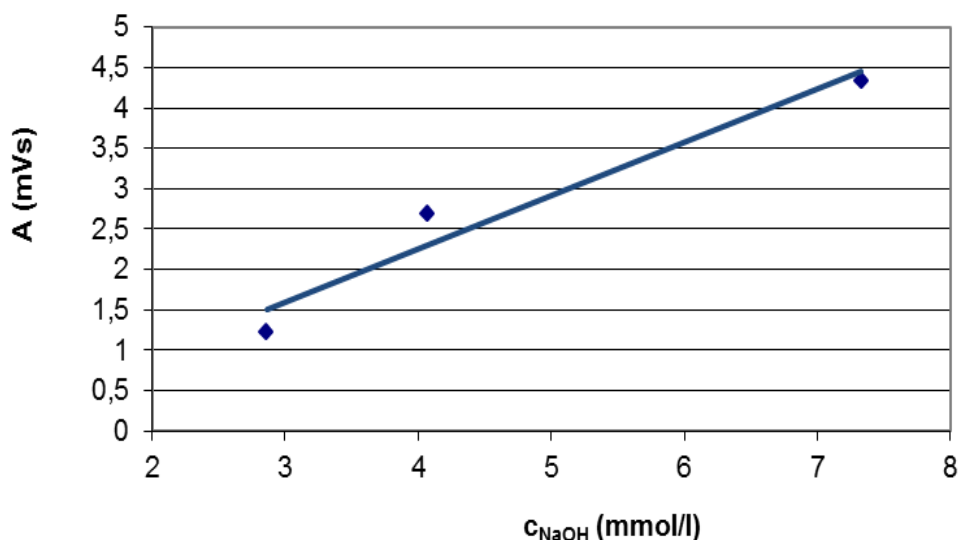
Ukázka výstupního signálu této reakce je znázorněna na obr. 29, kde jsou opět pro různé koncentrace NaOH uvedeny vždy tři naměřené křivky. Výstupní signál této reakce je výrazně nižší než bylo pro předchozí kalibrační reakci (viz. obr. 27). Výsledné plochy píků chemické kalibrace čipu TA12 pomocí zmíněné reakce jsou uvedeny v tab. 5.

Rovnice přímky  $A=f(c_{\text{NaOH}})$  znázorněné na obr. 30 má podobu  $y=0,6567x-0,3681$ , přičemž lze s použitím směrnice přímky  $k(x)$ , známé hodnoty  $\Delta H_r^{25^\circ\text{C}} = -58 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  a vztahu /27/ dopočítat citlivost čipu.

$$S = \frac{0,6567}{58000 \cdot 0,0000044} V \cdot W^{-1} = 2,57 V \cdot W^{-1}$$



Obr. 29 Ukázka průběhu výstupního signálu napětí při chemické kalibraci v závislosti na koncentraci hydroxidu sodného při konstantní koncentraci kyseliny chlorovodíkové



Obr. 30 Chemická kalibrace

Závislost plochy píku na koncentraci hydroxidu sodného pro reakci  $\text{NaOH} + \text{HCl} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{NaCl}$

Tab. 5 Výsledky vyhodnocení druhé chemické kalibrace čipu TA12

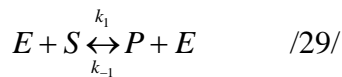
$c_{\text{NaOH}}$ (mmol/l)	A (mVs)
3	1,23±0,07
4	2,69±0,27
7	4,34±0,12
<b>Citlivost čipu TA12 (<math>\text{V} \cdot \text{W}^{-1}</math>)</b>	<b>2,57</b>

Citlivost čipu T12 byla druhou reakcí chemické kalibrace stanovena na  $2,57 \text{ V} \cdot \text{W}^{-1}$ .

Výrobce čipu NCM-9924 (firma Xensor Integration) udává citlivost čipu v rozmezí  $1,2\text{-}2,4 \text{ V} \cdot \text{W}^{-1}$  [40]. Elektrickou kalibrací byla zjištěna citlivost čipu  $2,30 \text{ V} \cdot \text{W}^{-1}$ , kalibrací chemickou pomocí reakce tris(hydroxymethyl)-aminomethanu s HCl  $2,02 \text{ V} \cdot \text{W}^{-1}$  (o 12 % nižší hodnota oproti kalibraci elektrické) a u reakce NaOH s HCl  $2,57 \text{ V} \cdot \text{W}^{-1}$ . Poslední zmíněnou reakci nelze pro kalibraci doporučit, vzhledem k nestabilitě NaOH a ke komplikovanému odečtu plochy píků. Plocha, kterou je nutné použít pro výpočet citlivosti, neodpovídá ploše celého píku, ale ploše pod křivkou odpovídající zakřivení následujícím bezprostředně za samotným píkem, které není u kalibrace pomocí HCl a tris(hydroxymethyl)-aminomethanu patrné (obr. 29). V důsledku toho má výsledná závislost nižší regresní koeficient R a nepřesnost kalibrace je tímto větší.

### 3.2 Kinetika enzymatické reakce studovaná pomocí mikrokalorimetru

V nejjednodušší formě může být enzymatická reakce formálně vyjádřena výrazem /29/.



$$K = \frac{[P] \cdot [E]}{[E] \cdot [S]} = \frac{\overset{\rightarrow}{k_1}}{\underset{\leftarrow}{k_{-1}}} = \frac{[P]}{[E]} \quad /30/$$

Rovnovážná konstanta  $K$  je vyjádřena výrazem /30/, kde  $k$  značí rychlostní konstantu;  $[E]$  koncentraci enzymu (mol/l);  $[S]$  koncentraci substrátu (mol/l);  $[P]$  koncentraci produktu (mol/l);  $K$  rovnovážnou konstantu [26].

Rovnovážná konstanta  $K$  tedy nezávisí na koncentraci enzymu. Enzymy sice ovlivňují rychlost reakce, ale nikoliv rychlostní konstanty, nemohou tedy ovlivnit ani  $K$ , která je jejich poměrem.  $K$  dané reakce je stejná, ať už bylo rovnováhy dosaženo za účasti enzymové katalýzy nebo bez ní. Enzymy mění cestu, kterou reakce probíhá, nemají však vliv na počáteční ani konečnou rovnovážnou koncentraci reaktantů a produktů [26].

Jako parametr charakterizující reakční rychlost byla zvolena konstanta  $K$ . Odvození vztahu pro tuto konstantu:

$$v_0 = \frac{V \cdot c_S}{K_m + c_S}$$

Pokud je koncentrace substrátu  $c_S$  značně menší, než je třeba pro dosažení poloviční maximální rychlosti (hodnota  $K_m$ ), počáteční rychlost je pak přímo úměrná koncentraci substrátu podle rovnice:

$$v_0 \approx \frac{V \cdot c_S}{K_m} \approx \frac{V}{K_m} \cdot c_S \approx K \cdot c_S \quad /31/$$

Pro  $K$  tedy plyne:

$$K = \frac{v_0}{c_S} \Rightarrow \frac{\text{mol} \cdot \text{l}}{\text{l} \cdot \text{s} \cdot \text{mol}} = \frac{1}{\text{s}} \quad /32/$$

Pokud je při enzymatické reakci koncentrace substrátu mnohem vyšší než koncentrace enzymů, stává se reakční rychlost nezávislou na koncentraci substrátu, což znázorňuje rovnice /33/; reakce je tedy vzhledem k substrátu nultého řádu [1, 26].

$$v_0 \approx \frac{V \cdot c_S}{c_S} \approx V \quad /33/$$

### 3.2.1 Výsledky posledních studií, zabývajících se reakcí trypsinu a substrátu BApNA

V této kapitole jsou v tab. 6, 7, 8 a 9 shrnuty poznatky o reakci trypsinu a substrátu BApNA, které publikovala Podzemná ve své dizertační práci [26].

## Změna entalpie reakce trypsinu s BApNA při použití různých pufrů

Tab. 6 Výsledky studia vlivu změny pufru na entalpii reakce trypsinu a substrátu BApNA

Pufr	pH	T (°C)	$\Delta H_r$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )
Tris-HCl+CaCl <sub>2</sub>	7,8	37	-13,0±0,4
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> +NH <sub>4</sub> OH	7,8	37	-65,0±4,4
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	7,8	37	-70,3±1,4

## Publikované hodnoty změny entalpie reakce trypsinu s BApNA

Tab. 7 Publikované hodnoty entalpie pro různé pufrů a pH

Pufr	pH	T (°C)	$\Delta H_r$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )
Tris-HCl	7,8	25	-48,4
Tris	7,8	25	-48,5
Tris	7,3	25	-28,7

## Vliv složení pufru na průběh enzymatické reakce trypsinu s BApNA

Tab. 8 Výsledky studia vlivu změny pufru na kinetiku reakce trypsinu a substrátu BApNA

$c_{enz}$ (mg/ml)	K (s <sup>-1</sup> )	
	Tris-HCl+CaCl <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> +NH <sub>4</sub> OH
1,49	0,233	0,197
2,98	0,178	0,162
4,46	0,143	0,129
5,95	0,110	0,098

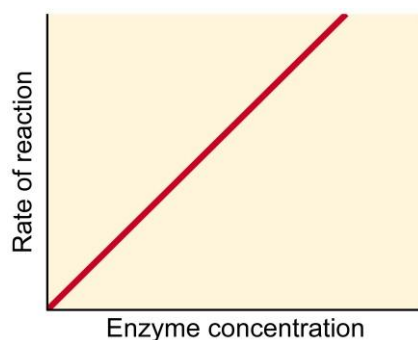
Z naměřených hodnot je zřejmý nezanedbatelný vliv prostředí na výslednou hodnotu reakční entalpie i na rychlost enzymatické reakce. Z údajů uvedených v předchozích tabulkách plyne, že snížení teploty (z 37 na 25 °C při pH 7,8) vede ke zvýšení reakční entalpie a z tab. 8 je patrné, že rostoucí koncentrace enzymu snižuje hodnotu konstanty  $K$ .

## 3.2.2 Poznátka z literatury zohledněné při vyhodnocování dat

### Vliv koncentrace enzymu na kinetiku enzymatické reakce

Za účelem studia vlivu rostoucí koncentrace enzymu na reakční rychlost, musí být substrát přítomen v nadbytku (enzym je nasycen substrátem), to znamená, že reakce musí být nezávislá na koncentraci substrátu. Změny v množství produktu vzniklého za určitý časový úsek budou závislé na množství přítomného enzymu. Graficky je tento problém znázorněn na obr. 31 [9, 35].



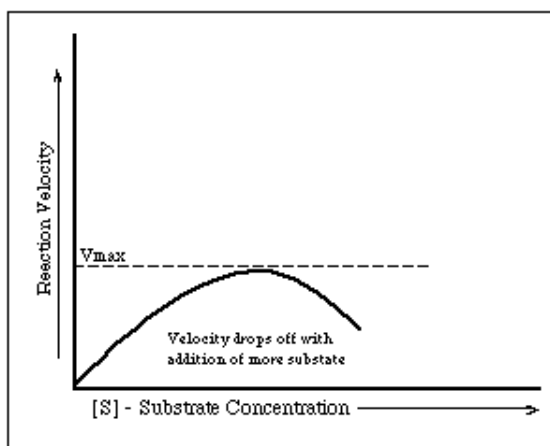


Obr. 31 Závislost aktivity enzymu na jeho koncentraci [34]

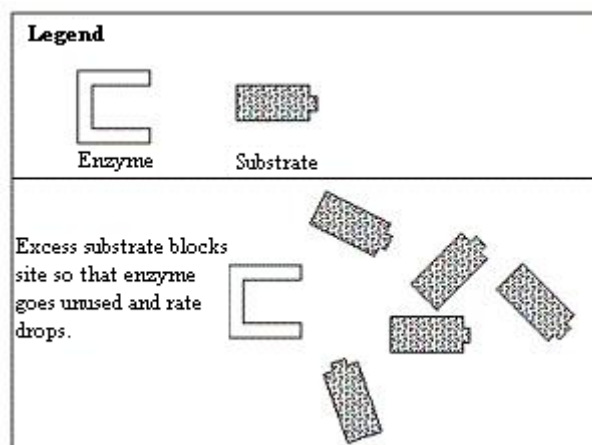
### Vliv koncentrace substrátu na kinetiku enzymatické reakce

Experimentálně bylo dokázáno, že pokud je množství enzymu konstantní a koncentrace substrátu je postupně zvyšována, pak reakční rychlost bude vzrůstat, dokud nedosáhne maximální hodnoty. V tu chvíli vzrůstající koncentrace substrátu nebude mít za následek zvyšující se rychlost reakce. Pokud by teoreticky bylo dosaženo hraniční rychlosti, znamenalo by to, že všechny dostupný enzym byl vázán do komplexu *ES*.

V případě, že je v reakční směsi přítomno nadměrné množství substrátu, může dojít k inhibici reakce substrátem. Obr. 32 znázorňuje, že reakční rychlost klesá po dosažení limitní rychlosti. V roztoku je tak velké množství molekul substrátu soutěžících o aktivní místo enzymu, že aktivní místa blokují (obr. 33) a zabrání dalším substrátovým molekulám tato místa obsadit. Reakční rychlost klesá, protože molekuly enzymu nejsou substrátem v tomto případě využity [9, 35].



Obr. 32 Inhibice substrátem [9]



Obr. 33 Inhibice substrátem [9]

### 3.2.3 Vliv teploty na rychlost enzymatické reakce

Podzemná ve své disertační práci [26] studovala reakci trypsinu a substrátu BApNA v prostředí pufru Tris-HCl+CaCl<sub>2</sub>, teplotě 37 °C, pH=7,8. Výsledky jejích měření jsou shrnuty v tab. 8 a byly použity za účelem sledování vlivu teploty na rychlost enzymatické reakce. V podobném rozmezí koncentrací enzymu byla sledována reakce ve stejném prostředí, ale při teplotě 25 °C, získané hodnoty konstanty *K* jsou pro nová měření i výsledky získané Podzemnou vyneseny v jednom grafu (obr. 34) a jsou uvedeny v tab. 9.

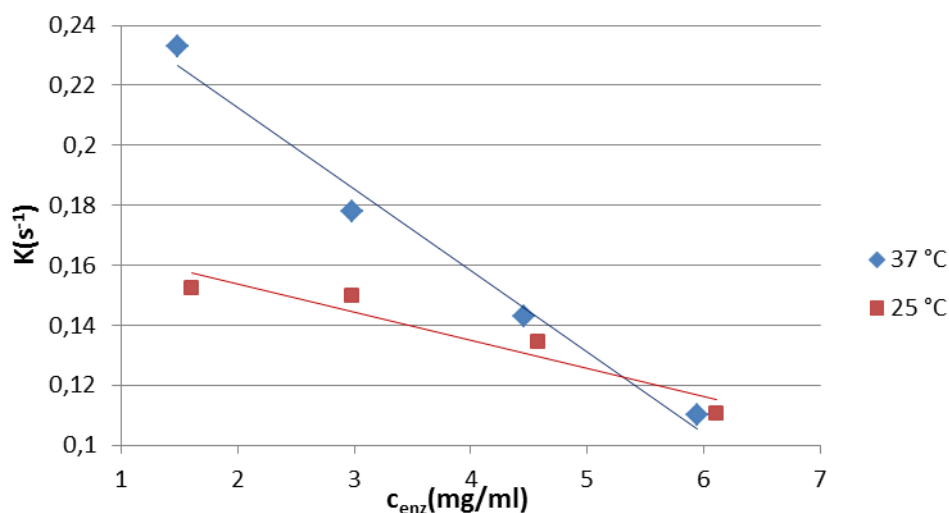
Tab. 9 Závislost teploty na rychlost enzymatické reakce

25 °C		37 °C	
<i>c</i> <sub>enz</sub> (mg/ml)	<i>K</i> (s <sup>-1</sup> )	<i>c</i> <sub>enz</sub> (mg/ml)	<i>K</i> (s <sup>-1</sup> )
1,61	0,152±0,003	1,49	0,233
2,98	0,150±0,004	2,98	0,178
4,58	0,134±0,008	4,46	0,143
6,11	0,111±0,011	5,95	0,110

Rovnice regresní přímky pro měření při 37 °C má tvar:  $K=0,2671-0,0272c_{enz}$

Rovnice regresní přímky pro měření při 25 °C má tvar:  $K=0,1727-0,0094c_{enz}$

Vliv teploty na rychlost enzymatické reakce byla sledována Podzemnou [26] u enzymu ureázy a invertázy. Byl potvrzen vliv rostoucí teploty na zvyšující se rychlost enzymatické hydrolýzy sacharózy. Na rozdíl od zmíněné invertázy, hydrolýza močoviny ureázou má při různých teplotách různé průběhy a také jiný trend. Při reakci invertázy se směrnice s teplotou zvyšovala, u ureázy směrnice klesá. V případě trypsinu má reakce při 25 a při 37 °C rovněž odlišný průběh. Na obr. 34 je patrný trend se zápornou směrnici, který je podrobněji diskutován v kap. 3.2.4. Modře značená závislost má absolutní hodnotu směrnice větší než závislost znázorněná červeně. Enzymatická reakce probíhající při 37 °C dosahuje oproti reakci při 25 °C vyšších hodnot *K*. To znamená, že rychlost enzymatické reakce trypsinu se zvyšující se teplotou roste.



Obr. 34 Vliv teploty na rychlost enzymatické reakce

Modře je znázorněna závislost studovaná Podzemnou [26], červeně závislost po změně teploty na 25 °C

### 3.2.4 Vliv koncentrace enzymu na kinetiku enzymatické reakce

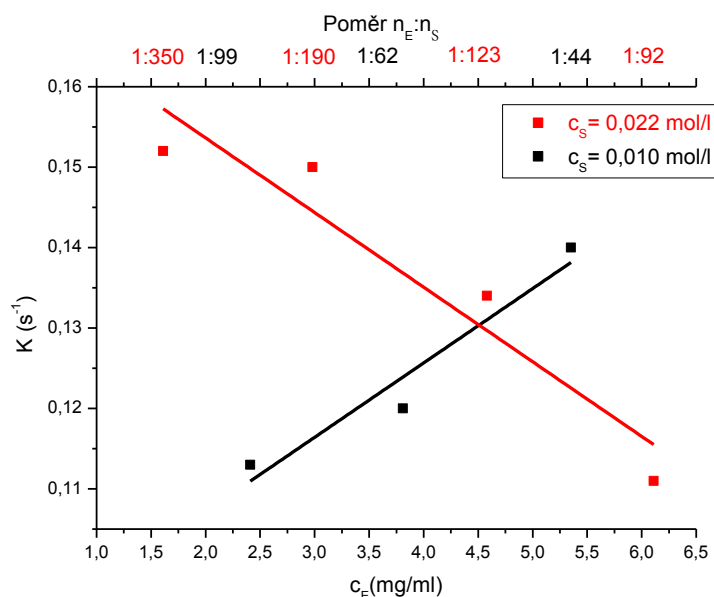
Reakce trypsinu a substrátu BApNA byla sledována v prostředí pufru Tris-HCl+CaCl<sub>2</sub> o pH=7,8 a při teplotě 25 °C. Byly provedeny dvě série měření pro různé poměry  $n_E:n_S$ . Hodnota  $K$  se vypočítala jako průměr pěti provedených měření pro jednotlivé koncentrace enzymu. Do grafu byly vyneseny koncentrace enzymu přepočítané na celkový objem reakční směsi 7,4  $\mu$ l.

K první sérii měření byly připraveny roztoky o koncentracích enzymu 2,70; 5,01; 7,71; 10,28 mg/ml. Koncentrace substrátu 0,022 mol/l (přepočítáno na celkový reakční objem 7,4  $\mu$ l) byla zachována konstantní. Výsledky měření jsou zaznamenány v tab. 10 a výsledná závislost je znázorněna na obr. 35 červeně.

K druhé sérii měření byly připraveny roztoky o koncentracích enzymu 4,06; 6,40; 9,00; 11,20 mg/ml. Koncentrace substrátu 0,010 mol/l (přepočítáno na celkový reakční objem 7,4  $\mu$ l) byla zachována konstantní. Výsledky měření jsou zaznamenány v tab. 11 a výsledná závislost je znázorněna na obr. 35 černě.

Tab. 10 Vliv koncentrace enzymu na rychlost reakce

$c_{enz}$ (mg/ml)	$K$ ( $s^{-1}$ )	Poměr $n_E:n_S$
1,61	0,152±0,003	1:350
2,98	0,150±0,004	1:190
4,58	0,134±0,008	1:123
6,11	0,111±0,011	1:92



Obr. 35 Vliv koncentrace enzymu na rychlost reakce trypsinu a substrátu BApNA

Tab. 11 Vliv koncentrace enzymu na rychlost reakce

$c_{enz}$ (mg/ml)	$K$ ( $s^{-1}$ )	Poměr $n_E:n_S$
2,41	0,113±0,003	1:99
3,81	0,120±0,005	1:62
5,35	0,140±0,006	1:44

Rovnice regresní přímky závislosti znázorněné červeně má tvar:  $y=0,1727-0,0094x$

Rovnice regresní přímky závislosti znázorněné černě má tvar:  $y=0,0093x+0,0887$

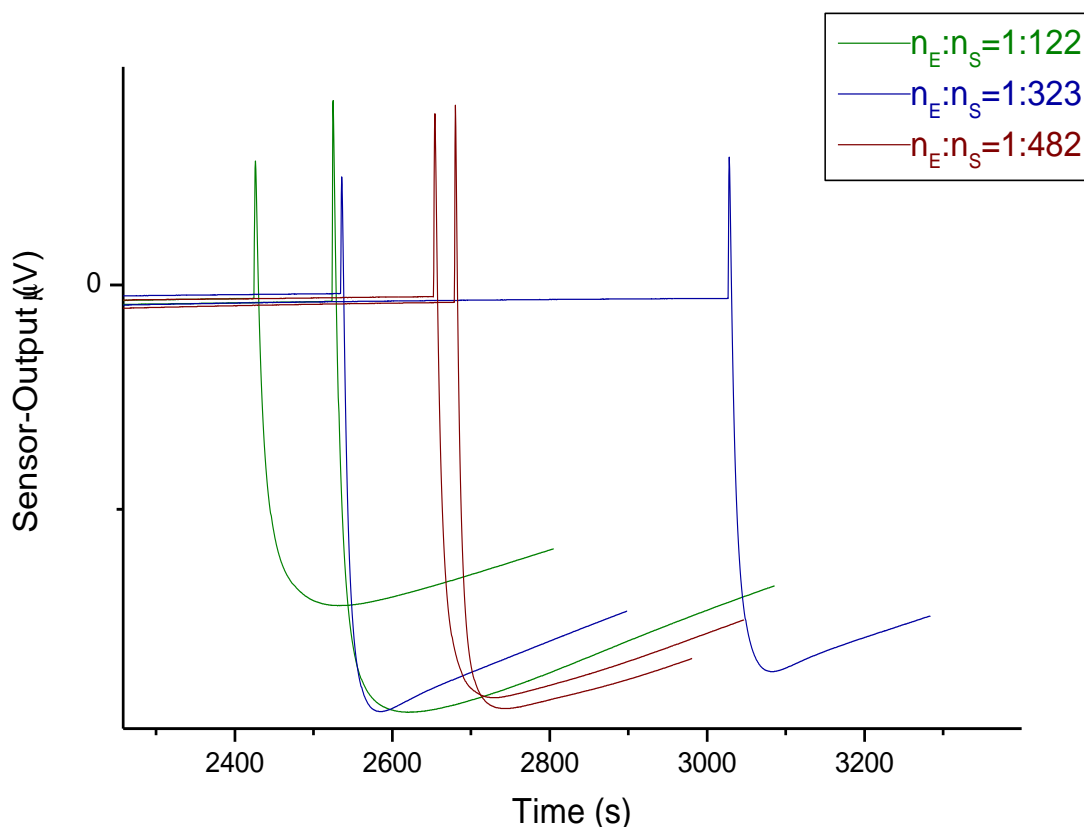
Při použití proteolytického enzymu je nutné počítat s enzymovou autolýzou. Při autolytické degradaci dochází s rostoucím časem ke ztrátě aktivity enzymu, čímž lze vysvětlit trend závislosti vyznačené na obr. 35 červeně. Autolýze lze zabránit změnou podmínek nebo připojením enzymu na pevnou fázi. Takto imobilizované enzymy jsou výrazně odolnější proti degradaci a mohou tak působit delší dobu [26]. Při použití nižších poměrů  $n_E:n_S$  (černě vyznačená závislost) je patrný odlišný trend díky potlačení autolýzy změnou podmínek měření. Dodavatel reagensií (firma Sigma Aldrich) doporučuje poměr látkových množství enzymu a substrátu 1:100 až 1:20. Při použití vyšších poměrů enzymu a substrátu (červeně vyznačená závislost) dochází k autolýze trypsinu.

### 3.2.5 Vliv koncentrace substrátu na kinetiku enzymatické reakce

Vliv koncentrace substrátu na reakční rychlost enzymatické reakce byl sledován pro reakci trypsinu a substrátu BApNA. Byly provedeny dvě série měření pro různé poměry  $n_E:n_S$ . Hodnota  $K$  se vypočítala jako průměr pěti provedených měření pro jednotlivé koncentrace substrátu. Do grafu byly vyneseny koncentrace substrátu přepočítané na celkový objem

reakční směsi 7,4  $\mu\text{l}$ . Měření byla provedena v prostředí pufru Tris-HCl+CaCl<sub>2</sub> při teplotě 25 °C.

Při první sérii měření byly použity koncentrace substrátu 0,020; 0,033; 0,036; 0,053; 0,074; 0,079 mol/l. Koncentrace enzymu měla po přepočtu na celkový reakční objem 7,4  $\mu\text{l}$  hodnotu 1,55 mg/ml a tato koncentrace se udržovala konstantní. Odezva signálu pro nejnižší a nejvyšší zvolenou koncentraci a pro koncentraci, při které probíhá reakce s největší rychlostí, je zobrazena na obr. 36. Výsledky měření jsou uvedeny v tab. 12.



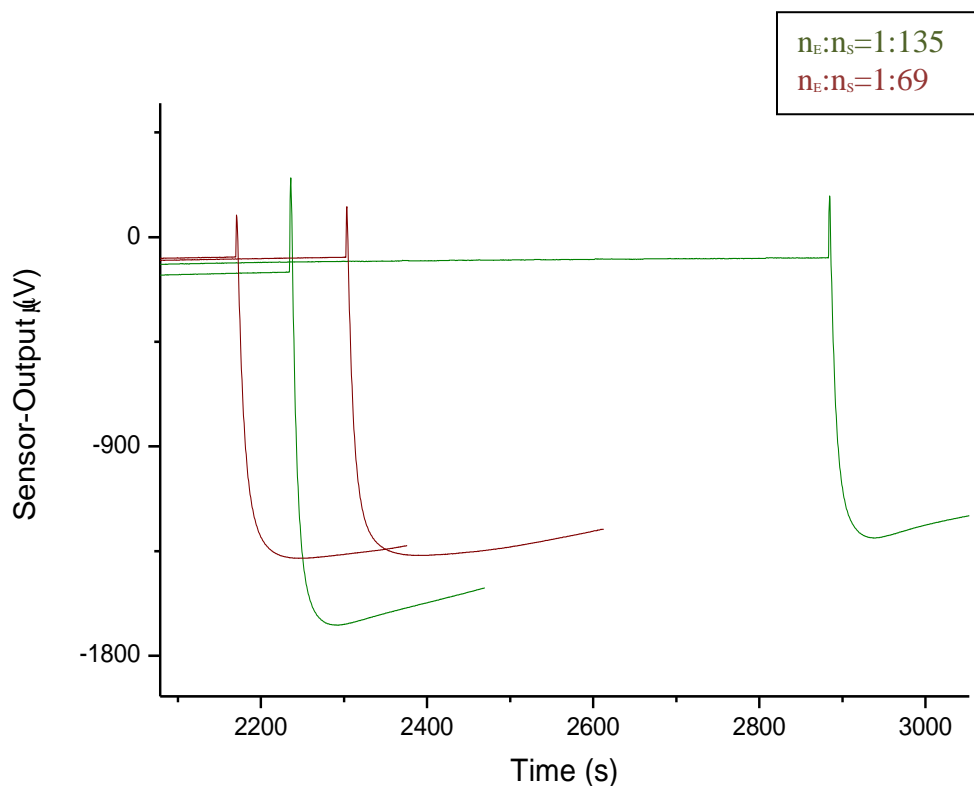
**Obr. 36** Ukázka odezvy signálu pro nejnižší a nejvyšší použitou koncentraci substrátu a pro koncentraci substrátu, při které probíhá reakce nejrychleji (nejvyšší  $K$ )

**Tab. 12** Vliv koncentrace substrátu BApNA na rychlost jeho reakce s trypsinem

$c_{\text{sub}}$ (mol/l)	$K$ (s <sup>-1</sup> )	Poměr $n_E:n_S$
0,008	0,077±0,019	1:122
0,013	0,095±0,003	1:201
0,014	0,111±0,007	1:219
0,022	0,125±0,015	1:323
0,030	0,122±0,007	1:451
0,032	0,112±0,004	1:482

Při druhé sérii měření byly použity koncentrace substrátu 0,039; 0,053; 0,059; 0,076 mol/l. Koncentrace enzymu měla po přepočtu na celkový reakční objem 7,4  $\mu\text{l}$

hodnotu 5,35 mg/ml a tato koncentrace se udržovala konstantní. Odezva signálu pro nejnižší a nejvyšší zvolenou koncentraci substrátu je zobrazena na obr. 37. Výsledky měření jsou uvedeny v tab. 13. Výsledná závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu je znázorněna v grafu na obr. 38 pro první sérii měření červeně a pro druhou sérii měření černě.

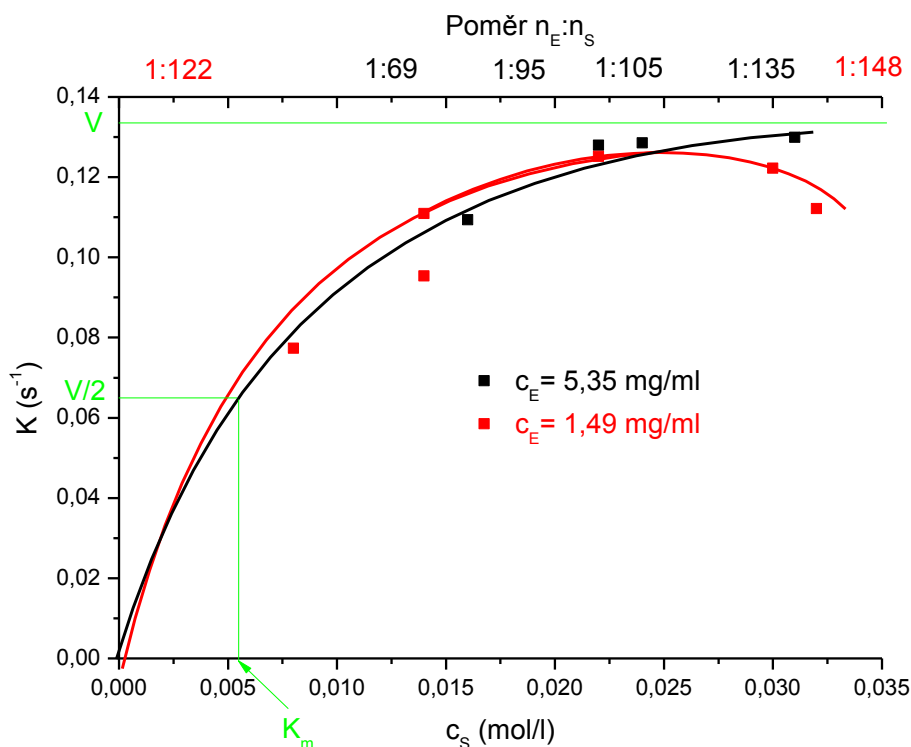


Obr. 37 Ukázka odezvy signálu pro nejnižší a nejvyšší použitou koncentraci substrátu

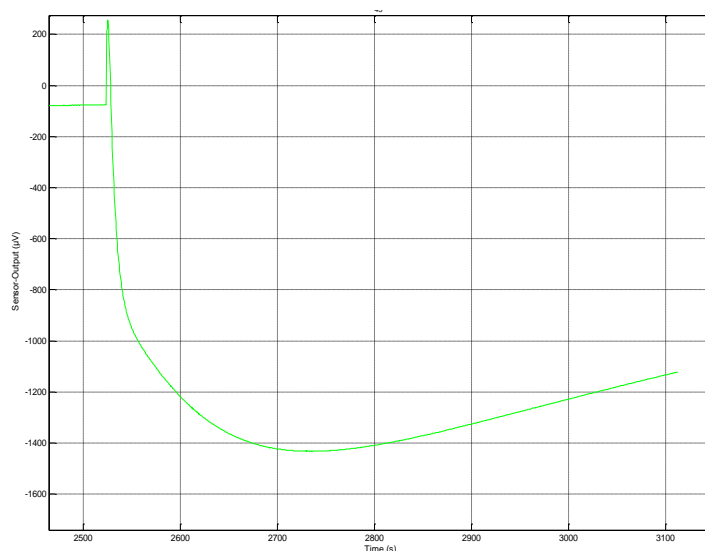
Tab. 13 Vliv koncentrace substrátu BApNA na rychlost jeho reakce s trypsinem

$c_{\text{sub}}$ (mol/l)	$K$ ( $s^{-1}$ )	Poměr $n_E:n_S$
0,016	0,109±0,010	1:69
0,021	0,128±0,007	1:95
0,024	0,108±0,004	1:105
0,031	0,130±0,004	1:135

Závislost znázorněná na obr. 38 červeně má při nižších koncentracích substrátu vzestupný charakter. Ke změně charakteru křivky dochází u koncentrací substrátu vyšších jak 0,022 mol/l. Rychlost enzymatické reakce dosáhne při této koncentraci limitní rychlosti  $V$  a při vyšších koncentracích substrátu již dochází k poklesu reakční rychlosti. Tento efekt je nejspíše způsoben inhibicí reakce substrátem. Mechanismus inhibice reakce substrátem je podrobněji popsán v kap. 3.2.2. Změnou poměru enzymu a substrátu lze tento efekt potlačit, což znázorňuje černá křivka. Při poměru  $n_E:n_S \sim 1:36$  je již signál nevyhodnotitelný (obr. 39). Tento bod proto nebyl do grafu zakreslen.



Obr. 38 Závislost rychlosti reakce na změně koncentrace substrátu



Obr. 39 Výstupní signál pro poměr  $n_E:n_S \sim 1:36$

Polovinu limitní rychlosti ( $V/2$ ) lze dopočítat pomocí vztahu /31/ z odhadnuté hodnoty  $K=0,0135 \text{ s}^{-1}$  v místě, značeném na obr. 38 zeleně značkou  $V/2$ . Z grafu lze také odhadnout hodnota Michaelisovy konstanty  $K_m$  na  $0,0054 \text{ mol/l}$  (vyznačeno na obr. 38 zeleně).

$$\frac{V}{2} = K \cdot K_m = 7,29 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$$

Hodnota limitní rychlosti  $V$  má hodnotu  $1,46 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$ .

V literatuře [49] je publikována hodnota Michaelisovy konstanty pro substrát BApNA hydrolyzovaný trypsinem:  $K_m=2,2 \text{ mM}$  (pH=7,8; 40 mM Tris-HCl+Ca<sup>2+</sup>; 25 °C). Řádově se hodnoty stanovené experimentálně v diplomové práci s literaturou [49] neliší. Vliv na

kinetiku enzymatické reakce má mimo jiné iontová síla, která se u obou experimentů liší díky odlišným koncentracím pufrů. Přesnější hodnotu  $K_m$  by bylo možné stanovit v případě dostupnosti většího množství experimentálních dat, které by bylo možné vynést do grafu závislosti  $K$  na  $c_S$ .

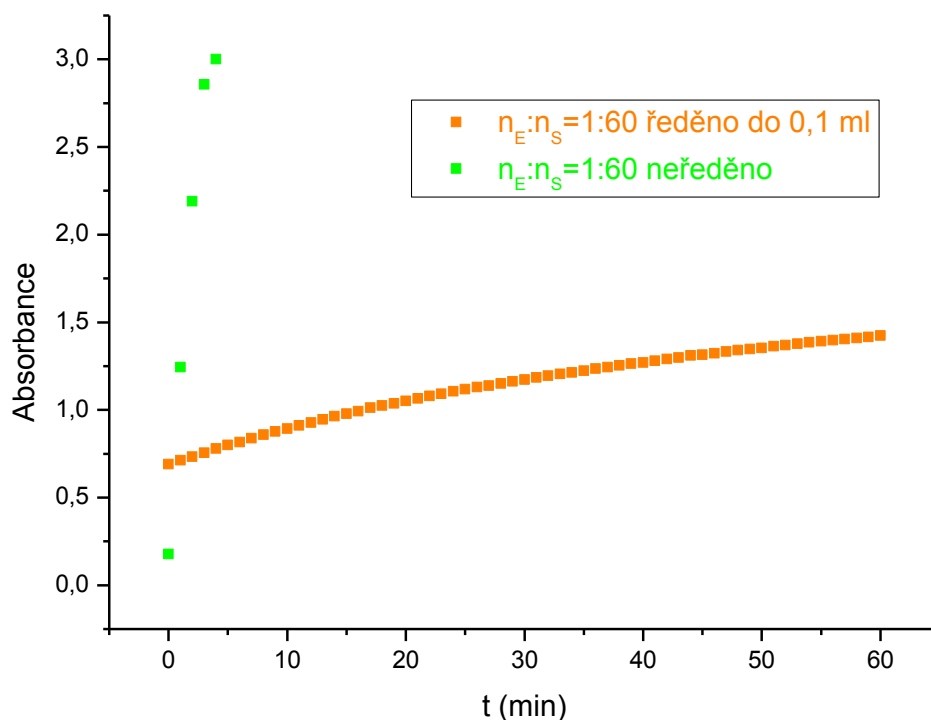
### 3.3 Kinetika enzymatické reakce studovaná spektrofotomericky pomocí BioPhotometeru plus

Reakce trypsinu se substrátem BApNA byla studována pomocí spektrofotometru v prostředí odpovídající podmínkám pro kalorimetrické sledování dané reakce (25 °C, pH=7,8, anorganický pufr Tris-HCl+CaCl<sub>2</sub> ve směsi s N,N-dimethylformamidem 1:1).

Při studiu vlivu změny koncentrace enzymu na rychlost enzymatické reakce pomocí mikrokolorimetru byla použita nejnižší koncentrace roztoku enzymu 2,5 mg/ml a koncentrace roztoku substrátu 0,055 mol/l (poměr  $n_E:n_S \sim 1:350$ ). Tento poměr enzymu a substrátu není pro metodu spektrofotometrie vhodný z důvodu získání signálu mimo detekční rozsah přístroje (absorbance je větší než 3). Proto byly podmínky experimentu upraveny a zvolen vhodnější poměr enzymu a substrátu. Snížením koncentrace substrátu se předpokládalo dosažení limitní rychlosti reakce. Podmínky experimentu byly proto upraveny a zvolen vhodnější poměr enzymu a substrátu. Na obr. 40 jsou zeleně znázorněny body, značící výsledek měření, kdy se na kyvetu napipetovalo 2,03  $\mu$ l substrátu ( $c=0,019$  mol/l) a 2,97  $\mu$ l enzymu (2,5 mg/ml) v poměru  $n_E:n_S \sim 1:60$ . Opět byla po dvou sekundách měření překročena hranice detekovatelné absorbance. Provedlo se proto naředění, jak je uvedeno v kap. 1.3.5, kdy se 4,4  $\mu$ l enzymu ( $c=2,5$  mg/ml) a 3  $\mu$ l substrátu ( $c=0,019$  mol/l) doplnilo na 100  $\mu$ l směsi pufru (oranžová křivka na obr. 40) a 5  $\mu$ l tohoto roztoku bylo pipetováno na kyvetu. Poměr  $n_E:n_S$  je zachován.

Na obr. 40 je patrné, že ani provedeným naředěním nedochází k ukončení reakce a substrát, který je ve velkém nadbytku, je dále přeměňován enzymem, čímž absorbance stále roste a odezva nevykazuje charakter limitního přibližování.





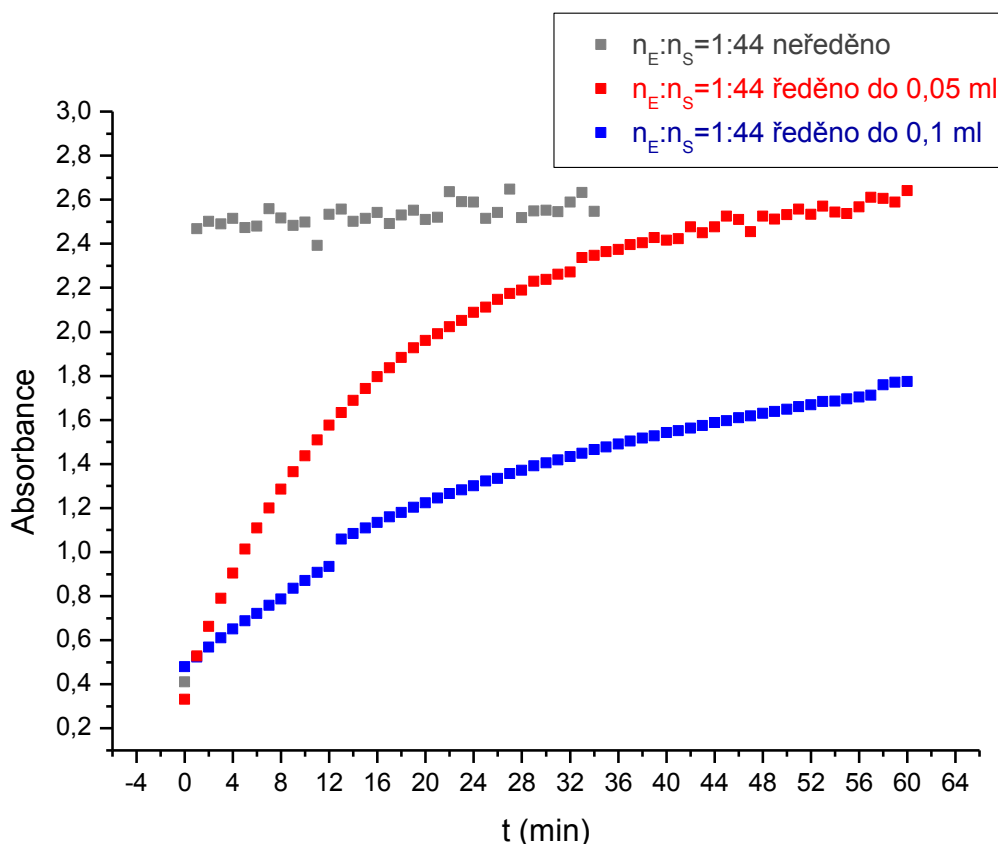
**Obr. 40 Kinetika enzymatické reakce sledovaná pomocí BioPhotometru plus v různých objemech  $n_E:n_S \sim 1:60$**

Po proměření druhé série vzorků na mikrokalorimetru a tedy po zjištění vhodnějších poměrů enzymu a substrátu byla provedena další série měření na spektrofotometru (obr. 41). Šedá křivka znázorňuje výsledek měření při napipetování 2,97  $\mu\text{l}$  enzymu o  $c=9 \text{ mg/ml}$  a 2,03  $\mu\text{l}$  substrátu o  $c=0,025 \text{ mol/l}$  ( $n_E:n_S=1:44$ ). Je patrné, že hned při druhé sekundě dochází k vzrůstu signálu na hranici, na které se signál udržuje po dobu měření 35 s, kdy se měření ukončilo díky rychlému proběhnutí reakce a minimálním změnám signálu. Tento problém se jako v předešlém případě řešil naředěním 4,4  $\mu\text{l}$  enzymu ( $c=9 \text{ mg/ml}$ ) a 3  $\mu\text{l}$  substrátu ( $c=0,025 \text{ mol/l}$ ) do 100  $\mu\text{l}$  a pipetováním 5  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku na kyvetu se zachováním poměru  $n_E:n_S=1:44$ . Výsledek měření znázorňuje modrá křivka (obr. 41) a je patrné, že opět nedochází po 60 min k zastavení reakce. Při použití nižšího ředění (červená křivka na obr. 41), kdy byly 4,4  $\mu\text{l}$  enzymu ( $c=9 \text{ mg/ml}$ ) a 3  $\mu\text{l}$  substrátu ( $c=0,025 \text{ mol/l}$ ) naředěny do 50  $\mu\text{l}$  pufrů, se po 45 min dosáhlo ukončení reakce, kdy hodnota absorbance kolísala a docházelo jen k pozvolnému růstu absorbance.

Červená křivka na obr. 41 dokazuje, že se podařilo optimalizovat podmínky měření pomocí spektrofotometru tak, aby kinetika reakce trypsinu sledovaná pomocí vzrůstající absorbance byla detekovatelná.

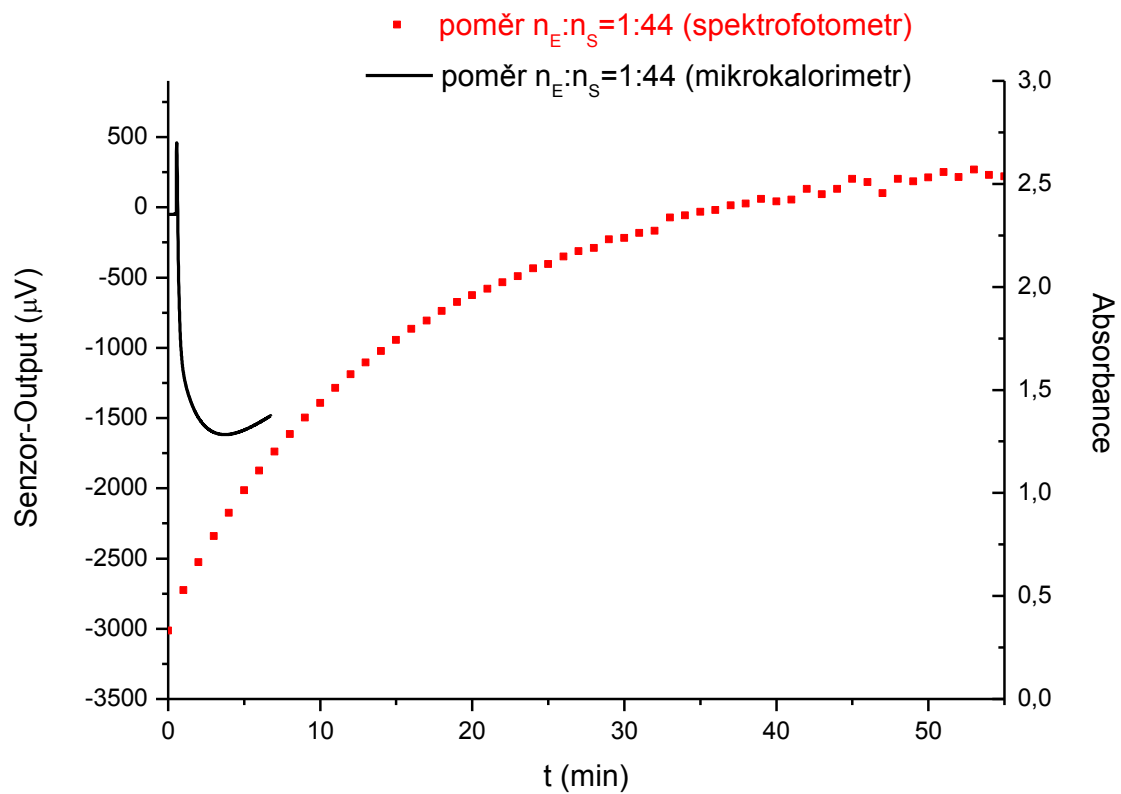
Koncentrace substrátu 0,025 mol/l byla použita při proměřování závislosti rychlosti enzymatické reakce na koncentraci enzymu pomocí mikrokalorimetru, přičemž koncentrace enzymu 9 mg/ml byla použita jako druhá nejvyšší koncentrace enzymu při určení této závislosti. Při proměřování závislosti rychlosti enzymatické reakce na koncentraci substrátu byla jako konstantní koncentrace enzymu použita hodnota 9 mg/ml a koncentrace substrátu

byly použity tak, aby splňovaly požadavek na ideální poměr enzymu a substrátu, doporučovaný dodavatelem reagensů [43].



**Obr. 41 Kinetika enzymatické reakce sledovaná pomocí BioPhotometeru plus v různých objemech  $n_E:n_S=1:44$**

Na obr. 42 je možné porovnat odezvu pro měření při optimalizovaných podmínkách metody spektrofotometrie (červená křivka, ředěno do 50  $\mu$ l) a mikrokalorimetrie (černá křivka) pro poměr enzymu a substrátu 1:44. Měření pomocí mikrokalorimetru je v obr. 42 znázorněno píkem, který odpovídá reakci enzymu a substrátu. Doba ustalování rovnováhy před smícháním reakčních komponent (40 min) není v grafu znázorněna.



*Obr. 42 Kinetika enzymatické reakce sledovaná pomocí BioPhotometru plus (červená křivka, ředěno do 50  $\mu$ l) a IC mikrokolorimetru (černá křivka) pro identické poměry  $n_E:n_S \sim 1:44$*

## 4 ZÁVĚR

Diplomová práce se zaměřuje na sledování kinetiky enzymatické reakce metodou mikrokolorimetrie a porovnání jejich výsledků se spektrofotometrií. K experimentům byla využita reakce trypsinu a jeho syntetického substrátu  $N\alpha$ -bezoyl-L-arginin-p-nitroanilid hydrochloridu (BAPNA).

Cílem práce bylo nalézt takové podmínky experimentu, aby akceptovaly omezení použitých technik a vyhovovaly požadavkům na měření a umožnily výsledky těchto identických měření na mikrokolorimetru a spektrofotometru přímo porovnat.

Současně byla sledována kinetika reakce trypsinu a substrátu BAPNA v závislosti na změně reakčních podmínek, jakými byla změna teploty, koncentrace enzymu, koncentrace substrátu nebo poměru látkových množství enzymu a substrátu. Cílem diplomové práce bylo navázat na výzkum Podzemné [26], která se této problematice věnovala ve své disertační práci.

Před studiem kinetiky enzymatické reakce byla provedena chemická a elektrická kalibrace a byla stanovena citlivost nově použitého čipu TA12. Chemická kalibrace je časově náročná a neumožňuje tak častou kontrolu správné funkčnosti zařízení jako elektrická kalibrace. Ovšem chemická kalibrace oproti kalibraci elektrické lépe simuluje tepelné proudění při studované reakci. Pro chemickou kalibraci je vhodné použít reakci tris(hydroxymethyl)-aminomethanu s HCl. Reakce NaOH a HCl není vhodná vzhledem k velké chybě výsledku.

Experimentálně bylo zjištěno, že s rostoucí teplotou okolí dochází k zvyšování rychlosti enzymatické reakce. Optimální teplota pro reakci trypsinu se uvádí 37°C.

Sledováním vlivu koncentrace enzymu na rychlost enzymatické reakce bylo zjištěno, že při vysokých poměrech enzymu a substrátu dochází vlivem autolýzy enzymu k poklesu rychlosti enzymatické reakce s rostoucí koncentrací enzymu. Po úpravě reakčních podmínek byl tento efekt potlačen. Minimální poměr enzymu a substrátu, který už nelze vyhodnotit, byl 1:36.

Závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu má odlišný průběh pro různé poměry enzymu vůči substrátu. Pro vyšší poměry lze sledovat inhibici reakce trypsinu substrátem v oblasti vysokých koncentrací substrátu, kdy dochází k opětovnému poklesu reakční rychlosti. Tento efekt byl potlačen použitím poměrů enzymu a substrátu doporučených dodavatelem reagentů (Sigma Aldrich). Z křivky je možné odhadnout hodnotu limitní rychlosti i Michaelisovy konstanty. Pro přesnější stanovení těchto hodnot by bylo vhodné mít k dispozici více experimentálních dat pro sestrojení grafu závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu.

Studie ale prokázaly, že reakce trypsinu a substrátu BApNA může vést k problémům. Bylo zjištěno, že L-izomer substrátu BApNA je náchylný enzymatické hydrolyze zatímco D-izomer se projevuje jako kompetitivní inhibitor [49].

Jako optimální pH reakce bylo použito pH=7,8, které bylo stanoveno experimentálně v práci [49]. Optimální pH pro reakci je takové, při kterém probíhá hydrolyza trypsinem nejrychleji. Enzymatická reakce trypsinu silně závisí na pH, protože histidinové a aspartátové zbytky jsou slabě zásadité a slabě kyselé a mezi jejich protonovaným a neprotonovaným stavem existuje rovnováha [18]. Přídavek  $\text{CaCl}_2$  v pufru slouží na stabilizaci a podpoření aktivity trypsinu [49].

Spektrofotometrická stanovení byla prováděna při vlnové délce 405 nm [46].

Bylo provedeno několik sérií měření na mikrokolorimetru i spektrofotometru za účelem najít vhodné podmínky měření shodné pro obě metody. Na obr. 42 je možné porovnat odezvu pro měření při optimalizovaných podmínkách metody spektrofotometrie (červená křivka; 4,4  $\mu\text{l}$  enzymu a 3  $\mu\text{l}$  substrátu ředěno do 50  $\mu\text{l}$ ) a mikrokolorimetrie (černá křivka; 4,4  $\mu\text{l}$  enzymu a 3  $\mu\text{l}$  substrátu) pro poměr enzymu a substrátu 1:44.

Závěrem lze konstatovat, že IC-kolorimetr je zařízení vhodné pro sledování kinetiky enzymatické reakce trypsinu a substrátu BApNA s omezením na požadovaný poměr enzymu a substrátu v reakci. Při nízkých poměrech enzymu a substrátu není signál vyhodnotitelný.

## 5 LITERATURA

[1] VOET, D., J. VOET, W. C. PRATT. *Fundamentals of biochemistry*. The United States of America : John Wiley & Sons, Inc., 1999. 931 s. ISBN 0-471-58650-1.

[2] VODRÁŽKA, Z., P. RAUCH a J. KÁŠ. *Enzymologie*, I. Praha: Ediční středisko VŠCHT, 1987, 177 s.

[3] VODRÁŽKA, Z., P. RAUCH aj. J. KÁŠ. *Enzymologie*. 2., přepracované. Praha: Ediční středisko VŠCHT, 1991, 245 s. ISBN 80-7080-124-7.

[4] KOOLMAN, J.; ROEHM, K. *Color Atlas of Biochemistry*. Second edition, revised and enlarged. Germany : Thieme, 2005. 467 s. ISBN 3-13-100372-3.

[5] BARTOVSKÁ, L.. Vschť.cz. *VŠCHT-Vysoká Škola Chemicko-Technologická v Praze* [online]. 2009 [cit. 2012-04-09].

Dostupné z: <http://www.vschť.cz/fch/cz/pomucky/bartovska/Kin-teorie/6-KatalyzovaneReakce.pdf>

[6] BENDER, L. a J. BRUBACHER. *Catalysis and enzyme action*. II. Title. the United States of America: McGraw-Hill Book Company, 1973. ISBN 0-07-004450-3.

[7] BURDA, J. <http://physics.mff.cuni.cz/>: *Fyzikální sekce Matematicko-fyzikální fakulty UK* [on-line]. [cit. 2012-04-09].

Dostupné z: <http://physics.mff.cuni.cz/kchfo/burda/OCh/Part09.pdf>

[8] VOET, D. a J. VOET. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-44-9.

[9] Enzyme Concentration (Introduction to Enzymes). WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION. [online]. 730 Vassar Ave., Lakewood, NJ 08701, 2012 [cit. 2012-02-29].

Dostupné z: <http://www.worthington-biochem.com/introbiochem/inhibitors.html>

[10] NOLAN, J. M. Tulane University-New Orleans, LA. [online]. 3.2.2012 [cit. 2012-04-09]. Dostupné z: <http://www.tulane.edu/~biochem/nolan/lectures/601/kinetics1.html>

[11] Stanovení enzymové aktivity. In *Wikiskripta* [online]. Praha : MEFANET, 16. 10. 2011, stránka naposledy změněna 16. 10. 2011 [cit. 2011-10-20]. Dostupné z WWW: <[http://www.wikiskripta.eu/index.php/Stanoven%C3%AD\\_enzymov%C3%A9\\_aktivity](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Stanoven%C3%AD_enzymov%C3%A9_aktivity)>.

[12] VŘEŠŤÁL, J. a M. OTYEPKA. *Statistická termodynamika, stručný úvod*. MU: Brno, 2004, s. 42-45. ISBN 80-210-3372-X.

[13] *Molecule of the Month* [online]. RCSB Protein Data Bank , October 2003 [cit. 2011-12-24]. Dostupné z WWW: <<http://www.pdb.org/pdb/101/motm.do?momID=46>>.

[14] Velký lékařský slovník On-Line. *Velký lékařský slovník* . Maxdorf, 2008 - 2011 [cit. 2011-12-24]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/acinus>

[15] Serine Proteases. 26 October 2011 [cit. 2011-12-25]. Dostupné z: [http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/S/Serine\\_Proteases.html](http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/S/Serine_Proteases.html)

[16] BUGG, T. *An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*. Oxford OX2 0EL, Osney Mead : Blackwell Science Ltd, 1997. 247 s. ISBN 0-86542-793-3.

[17] Trypsin - Worthington Enzyme Manual. *Worthington Biochemical Corporation*. 730 Vassar Ave., Lakewood, NJ 08701: Worthington Biochemical Corporation, 2011 [cit. 2011-12-24]. Dostupné z: <http://www.worthington-biochem.com/try/default.html>

[18] KAWAMURA, A., Y. YOSHIOKA, A. HARADA a K. KONO. Acceleration of Enzymatic Reaction of Trypsin through the Formation of Water-Soluble Complexes with Poly(ethylene glycol)-block-Poly( $\alpha,\beta$ -aspartic acid). *Biomacromolecules*. 2005, č. 6, s. 627-631.

[19] RABIŠKOVÁ, M. Lékové formy: Nanočástice pro lékové formy. *Remedia*. 2007, roč. 17, č. 5, s. 495-501.

[20] Serine protease: From Wikipedia, the free encyclopedia. *Wikipedia: The Free Encyclopedia*. 2009 [cit. 2011-12-26].

Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/Serine\\_protease](http://en.wikipedia.org/wiki/Serine_protease)

[21] VAN HOEF, V., et al. Functional analysis of a pancreatic secretory trypsin inhibitor-like protein in insects: Silencing effects resemble the human pancreatic autodigestion phenotype. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* [online]. September 2011, 41, 9, [cit. 2011-10-13].

Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/09651748/41/9>>.

[22] Trypsin. *Sigma-Aldrich*. 2011 [cit. 2011-12-24].

Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/trypsin.html#Reconstitution>

[23] Trypsin substrate and diagnostic device, and method of using same: Bayer Corporation. *Bayer Corporation* [online]. 2004-2012 [cit. 2012-02-26]. Dostupné z: <http://www.freepatentsonline.com/6770764.html>

[24] YAMASHITA, K., M. MIYAZAKI, H. NAKAMURA a H. MAEDA. Nonimmobilized Enzyme Kinetics That Rely on Laminar Flow. *J. Phys. Chem. A*. 2009, č. 113, s. 165-169.

[25] SCHEIDIG, A. J., et al. Crystal structures of bovine chymotrypsin and trypsin complexed to the inhibitor domain of Alzheimer's amyloid P-protein precursor (APPI) and basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI): Engineering of inhibitors with altered specificities. *Protein Science* [online]. 1997, 6, [cit. 2011-10-13].

Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9300481>>.

[26] PODZEMNÁ, V. *Využití čipového kalorimetru při studiu chemických reakcí*. Pardubice, 2011. Disertační práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce doc. Ing. Ladislav Svoboda, Csc.

[27] LIN, G., L. LIU a W. SHAO. Microcalorimetry studies on the antibacterial effect of crude monkshood polysaccharide. *Journal of Zhejiang University. Science. B* [online]. 2011, roč. 12, č. 7, s. 563–567 [cit. 2012-02-10].

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3134844/?tool=pubmed>

[28] WINTER, W. a G. W. H. HÖHNE. Chip-calorimeter for small samples. *Thermochimica Acta*. 2003, s. 43-53.

[29] PODZEMNÁ, V., M. SLOVÁKOVÁ, L. KOURKOVÁ a L. SVOBODA. Utilization of the IC-calorimeter for study of enzymatic reaction. *J Therm Anal Calorim*. 2010, 715-719. DOI: 10.1007/s10973-010-0951-1.

[30] MASKOW, T., T. SCHUBERT, A. WOLF, F. BUCHHOLZ, L. REGESTEIN, J. BUECHS, F. MERTENS, H. HARMS a J. LERCHNER. Potentials and limitations of miniaturized calorimeters for bioprocess monitoring. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011, č. 92, s. 55-66. DOI: 10.1007/s00253-011-3497-7.

[31] LERCHNER, J. Report on the workshop "Nanocalorimetry". *Thermochimica acta*. 2003, roč. 403, s. 43-53.

[32] LERCHNER, J., A. WOLF, G. WOLF, V. BAIER, E. KESSLER, M. NIETZSCH a M. KRÜGEL. A new micro-fluid chip calorimeter for biochemical applications. *Thermochimica Acta*. 2006, č. 445, s. 144-150. DOI: 10.1016/j.tca.2005.07.011.

Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

[33] VELICH, V. a M. KROUPA. *Kalorimetrické a termoanalytické metody*. Univerzita Pardubice Fakulta chemicko-technologická, Katedra anorganické technologie, společná laboratoř chemie a pevných látek AV ČR a Univerzity Pardubice.

[34] KODÍČEK, M., V. KARPENKO. *Biofyzikální chemie*. 2., přepr. a rozš. vyd. Praha 2 : Academia, 2000. 337 s. ISBN 80-200-0791-1.

[35] Chemistry for Biologists: Enzymes. ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. *Chemistry for Biologists: The chemical principles underlying biology* [online]. 2004 [cit. 2012-04-09].

Dostupné z: <http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/enzymes.htm>

[36] LERCHNER, J., T. MASKOW a G. WOLF. Chip calorimetry and its use for biochemical and cell biological investigations. *Chemical Engineering and Processing*. 2008, č. 47, s. 991-999. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

[37] Stanovení enzymové aktivity. In: *WikiSkripta* [online]. [cit. 2012-04-09]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Staven%AD\\_enzymov%C3%A9\\_aktivita](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Staven%AD_enzymov%C3%A9_aktivita)

[38] REHAK, N. N., G. JANES a D. S. YOUNG. Calorimetric Enzymic Measurement of Uric Acid in Serum. *Clin. chem*. 1977, roč. 23, č. 2.

[39] LERCHNER, J., A. WOLF a G. WOLF. Recent developments in integrated circuit calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 1999, č. 57, s. 241-251

[40] Xensor.nl. *Xensor Integration: Luquid Nanocalorimeters* [online]. The Netherlands, 12 October 2010 [cit. 2012-03-30].

Dostupné z: <http://www.xensor.nl/pdf/files/sheets/nanoliq.pdf>

[41] Zcu.cz: [http://www.kfy.zcu.cz/prakt/Prakt\\_II/UF140/1/spekol15.pdf](http://www.kfy.zcu.cz/prakt/Prakt_II/UF140/1/spekol15.pdf). *Západočeská Univerzita, Fakulta aplikovaných věd: Katedra fyziky*. 2006 [cit. 2011-12-24]. Dostupné z: [http://www.kfy.zcu.cz/prakt/Prakt\\_II/UF140/1/spekol15.pdf](http://www.kfy.zcu.cz/prakt/Prakt_II/UF140/1/spekol15.pdf)



- [42] Extinction coefficient: Wikipedia, the free encyclopedia. *Wikipedia: The Free Encyclopedia*. Wikimedia Foundation, Inc., 1 December 2011 at 02:12 [cit. 2011-12-25]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/Extinction\\_coefficient](http://en.wikipedia.org/wiki/Extinction_coefficient)
- [43] Product Information: Trypsin from porcine pancreas, Proteomics Grade, BioReagent, Dimethylated. *Sigma-aldrich.com*. [cit. 2011-12-25].
- [44] N $\alpha$ -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride  $\geq 99\%$  (TLC), suitable for substrate for trypsin: Sigma-Aldrich. *Sigma-Aldrich*. [cit. 2011-12-25]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=B3133|SIGMA>
- [45] GUIA, M. M. a E. SHAW. Studies on the Active Center of Trypsin: The binding of amidines and guanidines as models of the substrate side chain. *The Journal of Biological Chemistry*. 1965, roč. 240, č. 4, s. 1579-1585.
- [46] MARKWARDT, F., H. LANDMANN a P. WALSMANN. Comparative Studies on the Inhibition of Trypsin, Plasmin and Trombin by Derivatives of Benzylamine and Benzamidine. *European J. Biochem*. 1968, s. 502-506.
- [47] GONÇALVES, R., N. MATEUS, I. PIANET, M. LAGUERRE a V. DE FREITAS. Mechanisms of Tannin-Induced Trypsin Inhibition: A Molecular Approach. *Langmuir*,. 2011, roč. 27, č. 21, 13122–13129. DOI: 10.1021/la202280c.  
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/la202280c>
- [48] HOSSEININAVEH, V., A. BANDANI a F. HOSSEININAVEH. Digestive proteolytic activity in the Sunn pest, *Eurygaster intergriceps*. *Journal of Insect Science*. 2009, roč. 9, č. 70, s. 1-11. ISSN 1536-2442
- [49] PICHAIKANNU, S. *The effect of cations on trypsin kinetics using [DL-]BAPNA as the substrate*. San Jose State University, 2005.  
Dostupné z: [http://scholarworks.sjsu.edu/etd\\_theses/2806](http://scholarworks.sjsu.edu/etd_theses/2806). Master's Theses. San Jose State University.
- [50] KLOMKLAO, S., S. BENJAKUL, W. VISESSANGUAN, H. KISHIMURA a B. K. SIMPSON. Trypsin from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* [online]. 2007, č. 148, s. 382-389 [cit. 2012-04-17]. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [51] JELLOULI, K., A. BOUGATEF, D. DAASSI, R. BALTI, A. BARKIA a M. NASRI. New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes capricus*) with high activity at low temperature: Purification and characterisation. *Food Chemistry* [online]. 2009, č. 116, s. 644-650 [cit. 2012-04-17]. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- [52] GREEN, N. M. Competition among trypsin inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*. 1953, s. 535-551.
- [53] GONCALVES, R., N. MATEUS, I. PIANET, M. LAGUERRE a V. DE FREITAS. Mechanisms of Tannin-Induced Trypsin Inhibition: A Molecular Approach. *Langmuir*. 2011
- [54] ZHANG, Y., M. WANG a S. WEI. Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from the skin secretions of *Kaloula pulchra hainana*. *Toxicon* [online]. 2010(56), 502-507 [cit. 2012-01-02].

Dostupné z: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=secretions of Kaloula pulchra hainana](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=secretions+of+Kaloula+pulchra+hainana)

[55] KTARI, N., H. B. KHALED, R. NASRI, K. JELLOULI, S. GHORBEL a M. NASRI. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterisation and potential application as a detergent additive. *Food Chemistry* [online]. 2012, č. 130, s. 467-474 [cit. 2012-04-17]. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

[56]VAN HOEF, V., B. BREUGELMANS, J. SPIT, G. SIMONET, S. ZELS, J. BILLEN a J. V. BROECK. Functional analysis of pancreatic secretory trypsin inhibitor-like protein in insect: Silencing effects resemble the human pancreatic autodigestion phenotype. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2011, č. 41, s. 688-695 [cit. 2012-04-17]. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)