

## AMYLASY – VÝZNAM STANOVENÍ JEJICH AKTIVITY

LUDMILA ZAJONCOVÁ a MAREK ŠEBELA

*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc  
ludmila.zajoncova@upol.cz*

Došlo 26.10.06, přijato 7.11.06.

Klíčová slova: amylasa, inhibitory amylas, aktivita amylas, škrob, akutní pankreatitida

### Obsah

1. Úvod – význam enzymu  $\alpha$ -amylasy v lidské výživě
2. Škrob jako substrát  $\alpha$ -amylasy
3. Rozdělení amylas
4. Trávení škrobů v lidském těle
5. Molekulové vlastnosti  $\alpha$ -amylasy
6. Aktivátory a inhibitory  $\alpha$ -amylas a jejich význam
7. Význam monitoringu aktivity  $\alpha$ -amylasy v průmyslu a v klinické biochemii
8. Metody stanovení aktivity  $\alpha$ -amylasy
  - 8.1. Metody amyloklastické
  - 8.2. Metody sacharogenní
  - 8.3. Metody chromogenní
  - 8.4. Metody s biosenzorem
9. Závěr – význam amylas

### 1. Úvod – význam enzymu $\alpha$ -amylasy v lidské výživě

Živiny obsažené v lidské potravě lze rozdělit na tři základní skupiny: sacharidy, tuky a bílkoviny. Tyto živiny se štěpí na menší a jednodušší částice, jež se poté vstřebávají stěnou tenkého střeva, aby se nakonec dostaly do krevního oběhu. Ne všechno, co sníme, je stráveno. Část stravy, kterou se nepovede organismu rozložit, je z něj vyloučena. Nejmenší skupinu živin v lidské stravě tvoří proteiny, které jsou v ní zastoupeny asi z 20–25 %, a jsou rozloženy působením enzymů proteas. Trávení tuků, které tvoří 20–30 % v lidské stravě, katalyzují enzymy lipasy. Hlavní a nejdůležitější složku lidské výživy představují sacharidy (50–60 %). Sacharidy jsou hlavně ve formě škrobů, které trávicí systém štěpí za účasti enzymů amylas.

### 2. Škrob jako substrát $\alpha$ -amylasy

Škroby jsou hlavní složkou lidské potravy a podobně také pro mnoho dalších živočichů. Jsou syntetizovány v rostlinných buňkách jako nerozpustné granule složené z amylosy a amylopektinu<sup>1</sup>. Vysoký obsah škrobu je v kukuřici, bramborách, rýži a obilí. Škrobové molekuly jsou glukosové polymery<sup>2</sup>, kde glukosové jednotky jsou spojeny 1,4- $\alpha$  a 1,6- $\alpha$  glykosidovými vazbami. V tom se liší od celulosy, kde spojení glukosových jednotek je vytvořeno pomocí 1,4- $\beta$  glykosidových vazeb. Škrob je tvořen dvěma druhy polysacharidů, a to amylosou a amylopektinem. Poměr obou polysacharidů je různý podle druhu a odrůdy rostlin. Amylosa je tvořena dlouhými nerozvětvenými řetězci, složenými s glukosových zbytků, vzájemně spojených 1,4- $\alpha$  glykosidovými vazbami, přičemž tento řetězec má strukturu šroubovice, do jejíhož nitra lze navázat až 20 % jodu. Toho se využívá v analytické chemii při důkazech jodu. Relativní molekulová hmotnost bývá v rozmezí 150 000 až 600 000. Amylopektin obsahuje také D-glukosu vázanou vazbou 1,4- $\alpha$ , na rozdíl od amylosy však připadá na každých 20 až 25 glukosových jednotek jedno rozvětvení, kdy se nový řetězec váže způsobem 1,6- $\alpha$ . Počet glukosových jednotek v molekule amylopektinu se liší a bývá od několika tisíc do milionu. Pokud jsou sacharidy přijímány do těla v nadbytečném množství, jsou přeměněny na glykogen, je-li příjem ještě vyšší, tělo je přeměněno na tuky a v této podobě je uloží. Polymer glykogen se nachází hojně v játrech (8–10 % váhy) a svalové hmotě (2–3 % váhy). Glykogen má podobnou strukturu jako amylopektin, je však častěji větven. Velký počet neredukujících konců v glykogenu dovoluje rychlou mobilizaci uskladněné energie.

### 3. Rozdělení amylas

Amylasy katalyzuje hydrolýzu 1,4- $\alpha$ -D-glykosidových vazeb v polysacharidech (amylosa, amylopektin, glykogen) obsahujících tři a více takto vázaných D-glukosových jednotek. Reaguje se škrobem, glykogenem a odpovídajícími polysacharidy za vzniku dextrinu, maltotriosy a maltosy. Podle místa působení a vznikajících produktů rozlišujeme tři základní druhy amylas:  $\alpha$ -amylasy,  $\beta$ -amylasy a  $\gamma$ -amylasy.

$\alpha$ -Amylasy jsou extracelulární enzymy, které atakují 1,4- $\alpha$ -D-glykosidové vazby na kterémkoliv místě polymerů obsahujících tři a více těchto vazeb<sup>3</sup>. Dokážou obejít větvení s vazbou 1,6- $\alpha$ -D. Jedná se o endoglykosidasu,

systematicky o 1,4- $\alpha$ -D-glukan-glukanohydrolasu (EC 3.2.1.1). Produktem hydrolytického štěpení amylosy je směs glukosy a maltosy s hemiacetalovými hydroxyly uvolněnými jako  $\alpha$ -anomery. Amylopektin a glykogen jsou štěpeny náhodně na 1,4- $\alpha$ -D-glykosidových vazbách, přičemž 1,6- $\alpha$ -D vazby zůstávají nedotčeny. Vznikají tak větvené i nevětvené oligosacharidy ( $\alpha$ -dextriny). Rozlišují se dva druhy  $\alpha$ -amylasy: zkapalňující a zcukrující<sup>3</sup>. Zkapalňující  $\alpha$ -amylasa degraduje oligomery, které obsahují více jak 15 glukosových jednotek, zatímco zcukrující  $\alpha$ -amylasa štěpí již tetramery glukosy.

$\beta$ -Amylasy pravidelně štěpí 1,4- $\alpha$ -D-glykosidové vazby od neredukujícího konce polysacharidového řetězce<sup>3</sup>. Z amylosy vzniká prakticky kvantitativně maltosa, uvolňovaná jako  $\beta$ -anomer.  $\beta$ -Amylasy patří mezi exoglykosidasy, systematicky je tento enzym označován jako 1,4- $\alpha$ -D-glukan-maltohydrolasa (EC 3.2.1.2). Amylopektin a glykogen štěpí také z neredukujícího konce až k větvení 1,6- $\alpha$ -D, které enzym štěpit nemůže. Dextrin, vzniklý takovou hydrolyzou amylopektinu, se nazývá limitní dextrin a je to rovněž  $\beta$ -anomer. Amylasy postupně rozkládají dextriny dále, přičemž větvení 1,6- $\alpha$ -D-glykosidové vazby pomáhá hydrolyzovat amylo-1,6-glykosidasa.

$\gamma$ -Amylasy hydrolyzují samostatné glukosové jednotky z neredukujícího konce amylosy nebo amylopektinu. Systematicky se označuje jako 1,4- $\alpha$ -D-glukan-glukohydrolasa (EC 3.2.1.3). Je termostabilní<sup>3</sup> a štěpí polysacharidy na rozdíl od  $\alpha$ -amylasy nejen na vazbách 1,4- $\alpha$ -D-, ale i na vazbách 1,6- $\alpha$ -D (i když s mnohem menší rychlostí). Výsledkem její aktivity je  $\beta$ -D-glukosa, maltosa a limitní dextriny.

Vliv  $\alpha$ -amylasy na maltotriosy<sup>4</sup> za účelem vzniku maltosy a glukosy je slabý. Maltosa je zcela rezistentní vůči působení  $\alpha$ -amylasy. Protože pouze monosacharid může projít střevní stěnou, maltosa je dále hydrolyzována membránově vázanými hydrolasami ( $\alpha$ -glukosidasy) v kartáčovitém lemu enterocytů.

#### 4. Trávení škrobu v lidském těle

Trávení škrobu v lidském těle probíhá v několika stupních. Štěpení škrobu začíná v ústech, kde slinný enzym  $\alpha$ -amylasa zahajuje hydrolyzu 1,4- $\alpha$  glykosidových vazeb. Tento isoenzym je znám také jako ptyalin. Protože sousto setrvává v ústech jen velmi krátkou dobu, nemá pro trávení valný význam.

V tenkém střevě je trávení škrobu katalyzováno dvěmi různými skupinami hydrolas<sup>4</sup>. První skupinu tvoří pankreatické  $\alpha$ -amylasy, které vstupují do střevní dutiny. Většina polysacharidů se rozkládá na směs obsahující maltosu, maltotriosy a určitý počet 1,6- $\alpha$  a 1,4- $\alpha$  oligosacharidů. Druhá skupina hydrolas je imobilizována v kartáčovitém lemu enterocytů a zahrnuje disacharidasy (maltasa [EC 3.2.1.20], laktasa [EC 3.2.1.108] a sacharasa [3.2.1.26]),

trisacharidasy a glukoamylasy [3.2.1.3]. Výsledná směs oligosacharidů prochází přes hlenové vrstvy na kartáčovitou membránu tenkého střeva. Zde se funkce ujímá další enzym  $\alpha$ -glukosidasa (EC 3.2.1.20), která degraduje oligosacharidy na glukosu. Glukosa je absorbována a vstupuje do krevního oběhu. Člověk může strávit za 24 hodin až 2 kg škrobu<sup>4</sup>.

$\alpha$ -Amylasy se vyskytují nejen v rostlinných a živočišných buňkách, ale také v mikroorganismech<sup>3</sup>. Enzymy z různých zdrojů vykazují rozdílné fyzikální, chemické a katalytické vlastnosti. Nejlépe byly prostudovány  $\alpha$ -amylasy bakterií, z vepřového pankreatu a lidská amylasa.

#### 5. Molekulové vlastnosti $\alpha$ -amylasy

Lidská  $\alpha$ -amylasa je enzym produkovaný a uskladňovaný především buňkami slinné žlázy a buňkami exokrinního pankreatu. Má tedy dva hlavní isoenzymy: slinný a pankreatický. Lidská  $\alpha$ -amylasa<sup>5</sup> je glykoprotein složený z 496 aminokyselin v jednom polypeptidovém řetězci. V molekule proteinu jsou dvě volné SH skupiny a čtyři disulfidové můstky. Gen kódující lidskou  $\alpha$ -amylasu se nachází na chromosomu 1 a tvoří část multigenové rodiny. Geny pro  $\alpha$ -amylasu jsou regulovány tak, že jeden isoenzym je syntetizován v slinných žlázách (S-isoenzym) a druhý ve pankreatu (P-isoenzym). Zatímco P-isoenzym se vyskytuje výhradně v pankreatu, S-isoenzym se objevuje také v slzách, potu a v lidském mléku. Slinná a pankreatická  $\alpha$ -amylasa jsou vysoce homologní v primární struktuře (shoda 97 %, rozdíly pouze v 15 aminokyselinách). Jako glykoproteiny se však liší obsahem sacharidů, které mají vliv na konečnou molekulovou hmotnost (50 kDa – pankreatická a 51 kDa – slinná).  $\alpha$ -Amylasy mají optimální aktivitu<sup>6</sup> v neutrální oblasti pH (6,9–7,0), podobné prostředí se nachází ve střevech. Každá enzymová molekula vyžaduje přítomnost alespoň jednoho vápenatého ionu, který má význam pro její enzymovou aktivitu a také prevenci její destrukce v lidském střevě působením proteolytických enzymů<sup>7</sup>. Pro funkci  $\alpha$ -amylasy je také nezbytný chloridový ion<sup>8</sup>, optimální koncentrace  $\text{Cl}^-$  je asi 10 mM (cit.<sup>9</sup>).

Struktura lidské pankreatické  $\alpha$ -amylasy byla potvrzena použitím rentgenové difrakční analýzy<sup>10</sup>. Molekula enzymu je tvořena třemi strukturními doménami, označovanými A, B a C. Největší je doména A (1–99, 169–404), která je katalytickým jádrem. Její struktura je tvořena osmivláknovým  $\beta$ -barelovým motivem, na jehož jednom konci se nachází aktivní místo tvořené aminokyselinovými zbytky Asp 197, Glu 233 a Asp 300. Nejmenší doména B (100–168) je smyčkovou oblastí vycházející z domény A. Doména C (405–496) je pouze volně spojena s doménami A a B, jedná se o globulární jednotku s  $\beta$ -prvky. Domény A a B jsou spojeny třemi funkčně důležitými místy: aktivním místem a vazebnými místy vápenatých a chloridových iontů. Aktivní místo enzymu je prohlubeň ve tvaru V, lo-

kalizovaná na karboxylovém konci  $\beta$ -barelu domény A. Klíčové aminokyselinové zbytky tvořící vazebné místo chloridových iontů jsou Arg195, Asn298 a Arg337. Tyto zbytky jsou v přímé blízkosti aktivního místa a tvoří síť vodíkových vazeb, do níž jsou zapojeny také katalytické zbytky Asp197 a Asp300. Vazebné místo vápníku je důležité pro stabilitu polypeptidového řetězce. Vápenaté ionty nehrají přímou roli v katalýze, ale utváří správnou konformaci aktivního místa. Klíčovým aminokyselinovým zbytkem je Asn100, který je spojen vodíkovou vazbou s katalytickým Asp197 a ten následně interaguje s chloridovým iontem.

## 6. Aktivátory a inhibitory $\alpha$ -amylas a jejich význam

Aktivita  $\alpha$ -amylas je ovlivňována celou řadou látek. Sloučeniny, které způsobují zvýšení aktivity, se nazývají aktivátory. Mezi ně patří např. chloridové ionty, které allosterickeým efektem<sup>8</sup> zvyšují aktivitu vepřové pankreatické amylasy. Vápenatý ion, který je součástí  $\alpha$ -amylas, má velký význam pro jejich aktivitu. Odstranění vápenatého ionu z enzymu vede ke ztrátě aktivity, která však může být zpětně částečně obnovena nahrazením vápenatého ionu<sup>11</sup> některým z iontů ze skupiny lanthanoidů ( $\text{Lu}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Pr}^{3+}$ ).

Sloučeniny, které snižují aktivitu  $\alpha$ -amylas, jsou jejich inhibitory a lze je rozdělit do dvou základních skupin. První skupinu tvoří jednoduché neproteinové sloučeniny, do druhé řadíme peptidy a proteiny. V tabulce I jsou uvedeny příklady inhibicí  $\alpha$ -amylas<sup>12</sup> z různých zdrojů neproteinovými sloučeninami. Aktivitu  $\alpha$ -amylas snižují nejrůznější anorganické ionty, ale také např. 2-deoxyglukosa, maltosa, kyselina citronová, arabitol, xylitol, ethylenglykol a další.

V posledních letech se do popředí zájmu dostávají proteinové inhibitory  $\alpha$ -amylas, které se využívají jako léčebné škrobové blokátory v lidském těle nebo mají význam při ochraně kulturních plodin před různými škůdci a patogeny. Škrobové blokátory<sup>13,14</sup> jsou syntetizovány v rostlinách jako jsou např. fazole (*Phaseolus vulgaris*) nebo pšenice (*Triticum aestivum*). Purifikovaný extrakt škrobových blokátorů z těchto rostlin se dostává do těla společně s potravou a zabraňuje tak štěpení škrobů  $\alpha$ -amylasami vylučovanými do střev buňkami pankreatu. Výsledkem tohoto působení je snížení hladiny krevního cukru, což kladně ovlivňuje život lidí trpících nemocí *diabetes melitus*, pomáhá také při léčbě obezity a vede ke ztrátě hmotnosti<sup>15–18</sup>.

Vlivem působení hmyzu a různých patogenů (viry, houby, bakterie) na rostliny dochází k vážným škodám na kulturních plodinách. Luštěniny, které jsou bohatou zásobárnou škrobů a bílkovin, jsou ohroženy celou řadou škůdců, kteří v semenech lusek vytvářejí úkryty a dále se v nich rozmnožují. Během vývoje si rostliny vytvořily určité obranné mechanismy<sup>19</sup> a staly se odolnější vůči působení

těchto škůdců. Tato obrana spočívá v syntéze určitých sloučenin (sekundárních metabolitů) jako jsou antibiotika, alkaloidy, terpeny, kyanogenní glykosidy a některé proteiny. Mezi tyto proteiny patří chitinasy,  $\beta$ -1,3-glukanasové enzymy, lektiny a enzymové inhibitory<sup>20–23</sup>. Enzymové inhibitory jsou důležitou zbraní proti trávicím hydrolasám ( $\alpha$ -amylasy a proteinasy) hmyzu a dalších škůdců. Několik druhů  $\alpha$ -amylasových a proteinasových inhibitorů přítomných v semenech a vegetativních orgánech rostlin reguluje působení fytopatogenního hmyzu<sup>24–26</sup>. Proteinové inhibitory  $\alpha$ -amylas byly nalezeny hlavně v obilovinách jako je pšenice (*Triticum aestivum*)<sup>27</sup>, ječmen (*Hordeum vulgareum*)<sup>28</sup>, čirok (*Sorghum bicolor*)<sup>29</sup>, žito (*Secale cereale*)<sup>30</sup>, rýže (*Oryza sativa*)<sup>31</sup>, ale také v luštěninách jako je vigna (*Vigna unguiculata*)<sup>32</sup> a fazole (*Phaseolus vulgaris*)<sup>33,34</sup>. Tyto inhibitory vykazují monomerní molekulovou hmotnost 5 kDa (cit.<sup>29</sup>), 9 kDa (cit.<sup>32</sup>) a 13 kDa (cit.<sup>35</sup>), homodimerní a heterodimerní hmotnost je přibližně 26 kDa (cit.<sup>35</sup>) a tetramerní hmotnost je okolo 50 kDa (cit.<sup>36</sup>). Amylasové inhibitory z různých druhů rostlin vykazují rozdílné specifity<sup>19</sup> vůči amylasám z různých zdrojů. Určení specifity inhibice je prvním krokem při vývoji inhibitoru, který by mohl být použitelný pro vytváření vůči hmyzu rezistentních transgenních rostlin. V některých případech  $\alpha$ -amylasové inhibitory inhibují pouze savčí  $\alpha$ -amylasy, v jiných případech tomu může být naopak a  $\alpha$ -amylasové inhibitory inhibují jen  $\alpha$ -amylasy hmyzu. Často bývá funkce amylasového inhibitoru doplněna o funkci proteinasového inhibitoru, pak hovoříme o bifunkčních inhibitech<sup>19</sup>.

## 7. Význam monitoringu aktivity $\alpha$ -amylas v průmyslu a v klinické biochemii

$\alpha$ -Amylasy je důležitý průmyslový enzym<sup>37</sup> a stanovení její aktivity je žádoucí v mnoha oborech. Enzym je součástí různých detergentů a pracích prášků a využívá se k odstraňování škrobových skvrn z textilií. V pekařském průmyslu působení amylasy na škrob slouží ke vzniku dextrinů.  $\alpha$ -Amylasy se hojně používají v biotechnologických procesech k degradaci škrobu a v syntetické chemii při výrobě oligosacharidů transglykosylací. Největší význam má stanovení aktivity  $\alpha$ -amylasy v klinické biochemii.

Změny v aktivitě  $\alpha$ -amylasy v krevním séru a moči jsou příčinou řady onemocnění. Hodnoty aktivity  $\alpha$ -amylasy mohou být jak zvýšené, tak naopak snižené<sup>38</sup>. Jednou z příčin zvýšené aktivity  $\alpha$ -amylasy v krvi je onemocnění slinných žláz – parotitida, sialolitíza, trauma či nádor. Zvýšená aktivita amylasy v krvi nastává po nástupu akutní pankreatitidy. Při akutní pankreatitidě dochází k poškození acinózních buněk pankreatu, onemocnění může ohrožovat život. Závažnost onemocnění spočívá v aktivaci pankreatických proteolytických enzymů přímo v produkujících buňkách s následnou destrukcí pankreatu. Aktivita  $\alpha$ -amylasy stoupá v séru za 3 až 12 hodin po atace a dosahuje

Tabulka I  
 Příklady neproteinových inhibitorů  $\alpha$ -amylasy<sup>12</sup>

Inhibitor	Původ $\alpha$ -amylasy	Podmínky pro inhibici
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<i>Sacharomycopsis figuligera</i>	
1,10-Fenanthrolin	<i>Bacillus subtilis</i>	1 mM, 39% inhibice
2,4-Dinitro-1-fluorbenzen	<i>Aspergillus oryzae</i>	6 mM
2-Deoxyglukosa	<i>Struthio camelus</i>	
2-Merkaptoethanol	<i>Streptomyces megasporus</i>	1 mM, 23% inhibice
Acarbosa	<i>Homo sapiens</i>	
Ag <sup>+</sup>	<i>Streptomyces megasporus</i>	1 mM, 77% inhibice
Al <sup>3+</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>	2 mM, 38,7% inhibice
Arabitol	<i>Aspergillus flavus</i>	Kompetitivní inhibice
Ba <sup>2+</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>	5 mM, 28% inhibice
Ca <sup>2+</sup>	<i>Bacillus circulans</i>	5 mM, 21% inhibice
Cd <sup>2+</sup>	<i>Bacillus sp.</i>	1 mM, 91% inhibice
Kyselina citronová	<i>Micrococcus luteus</i>	25 mM, 54% inhibice
Co <sup>2+</sup>	<i>Bacillus circulans</i>	5 mM, 91% inhibice
Cu <sup>2+</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>	2 mM, kompetitivní inhibice
EDTA	<i>Bacillus sp.</i>	10 mM, 90% inhibice
Ethylenglykol	<i>Aspergillus flavus</i>	
Fe <sup>2+</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>	5 mM, 71% inhibice
Glycerol	<i>Aspergillus flavus</i>	Kompetitivní inhibice
Hg <sup>2+</sup>	<i>Pseudomonas sp.</i>	2 mM, kompetitivní inhibice
Chelerythrin	<i>Homo sapiens</i>	2,5 mM, 23,3% inhibice
Jodacetat	<i>Bacillus sp.</i>	0,5 mM, 98% inhibice
KCN	<i>Micrococcus luteus</i>	25 mM, 70% inhibice
Maltosa	<i>Aspergillus awamori</i>	Akompetitivní inhibice
Mg <sup>2+</sup>	<i>Thermomonospora vulgaris</i>	10 mM, 86% inhibice
Mn <sup>2+</sup>	<i>Thermomonospora vulgaris</i>	1 mM, 84% inhibice
Močovina	<i>Homo sapiens</i>	
Ni <sup>2+</sup>	<i>Bacillus circulans</i>	5 mM, 91% inhibice
Pb <sup>2+</sup>	<i>Pseudomonas sp.</i>	2 mM, 53% inhibice
Sanguinarin	<i>Homo sapiens</i>	2,5 mM, 47,7% inhibice
Sorbitol	<i>Aspergillus flavus</i>	Kompetitivní inhibice
Sr <sup>2+</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>	5 mM, 36% inhibice
Xylitol	<i>Aspergillus flavus</i>	Kompetitivní inhibice
Zn <sup>2+</sup>	<i>Bacterium</i>	1 mM, 87% inhibice

je pětinasobného zvýšení nad horní referenční mez. Vzhledem ke krátkému biologickému rozpadu enzymu (6 až 12 hodin) dochází u nekomplikovaného průběhu k normalizaci do 3 dnů. Vytvoří-li se ascites (výpotek), je v jeho tekutině aktivita amylasy ještě mnohem vyšší. Protože molekula  $\alpha$ -amylasy je poměrně malá, lze ji prokázat také v moči, kde lze najít zvýšenou aktivitu s několika-

hodinovým zpožděním oproti nálezů v séru. V případě pankreatitidy je zvýšena aktivita pouze P-isoenzymu  $\alpha$ -amylasy (pankreatického).

Další příčinou zvýšené aktivity  $\alpha$ -amylasy projevující se jako akutní břišní příhoda je recidiva chronické pankreatitidy, penetrující žaludeční vřed, přetlak ve žlučových cestách při biliární kolice či po podání opiátů, úraz nebo

operace pankreatu.

Na druhé straně se v klinické biochemii sleduje snížení aktivity  $\alpha$ -amylasy v moči, které může být zapříčiněno renální insuficiencí nebo makroamylazémií, které je způsobeno navázáním enzymu na imunoglobulin (IgG nebo IgA). V krvi se pak hromadí vzniklý makromolekulární komplex, který je tak velký, že neprojde glomerulem. Stav bývá doprovázen bolestmi v břiše a při neznalosti může vést k diagnóze pankreatitidy. Příčina je neznámá, snad jde o určitý typ autoprotilátky. Makroamylasa může kolovat v krvi roky, aniž by byla známkou porušené funkce pankreatu. Podezření na přítomnost makroamylasy budí snížení frakční exkrece amylasy pod 1%. K definitivnímu průkazu je třeba užít metodu určující velikost molekuly enzymu (např. gelovou chromatografií).

## 8. Metody stanovení aktivity $\alpha$ -amylasy

V literatuře bylo popsáno několik stovek metod pro monitorování aktivity  $\alpha$ -amylasy. Požadavky na stanovení aktivity amylasy jsou kladeny zejména z oblasti klinické biochemie, kde změněná aktivita enzymu diagnostikuje závažné onemocnění. Metody stanovení aktivity amylasy jsou v literatuře děleny podle způsobu detekce na metody amyloklastické, sacharogenní, chromogenní. V posledních letech se objevila celá řada biosenzorů, které využívají některý z principů výše jmenovaných metod. Základ pro amyloklastické a sacharogenní metody položili v roce 1908 Wohlgemuth<sup>39</sup> a v roce 1938 Somogyi<sup>40</sup>. Wohlgemuthova semikvantitativní metoda stanovení aktivity  $\alpha$ -amylasy sloužila v klinické biochemii téměř půl století.

### 8.1. Metody amyloklastické

Metody amyloklastické měří změny koncentrace substrátu v reakční směsi. Substrátem je ve většině případů škrob, ale používá se také barvený amylopektin<sup>41</sup> nebo amylosa<sup>42</sup>. Sleduje se ztráta nebo snížení některé vlastnosti škrobového substrátu, většinou se jedná o schopnost tvorby modrého komplexu s jodem<sup>41,43,44</sup>, pak hovoříme o jodometrických metodách. Při těchto metodách je rozpustný škrobový roztok inkubován<sup>45</sup> se zkoumanou  $\alpha$ -amylasou a poté je část reakční směsi přidána do jodového roztoku a při 620 nm je pozorován vznik barevného produktu. Při štěpení substrátu vznikají řetězce různé délky. Swanson<sup>46</sup> pozoroval, že řetězce 4–6 glukosových jednotek nedávají žádné zbarvení s jodem. Řetězce 8–12 glukosových jednotek se barví jodem do červena a řetězce delší jak 30 glukosových jednotek dávají s jodem modré zbarvení.

Vedle jodometrických metod lze změny koncentrace substrátu sledovat pomocí metod viskozimetrických, turbidimetrických či nefelometrických. Turbidimetrické metody měří snížení zářivého toku světelného paprsku, k němuž dochází rozptylem světla na částicích rozptýlených v kapalině. Měření lze provádět s běžnými fotometry nebo spektrofotometry. Při stanovení aktivity amylasy se

používá jako substrát nerozpustný amylopektin a sleduje se rychlost snížení turbidity při 340 nm (cit.<sup>47</sup>). Na podobném principu jsou založeny i nefelometrická stanovení aktivity  $\alpha$ -amylasy. Nefelometrie měří tok záření vzniklého rozptylem paprsků zdroje na částicích roztoku. Kinetická nefelometrická metoda<sup>48,49</sup> je základem automatu Perkin-Elmer Model 91 Analyzer pro stanovení aktivity amylasy. Nefelometrické zařízení je však cenově nákladnější.

Škrobová hydrolyza katalyzovaná  $\alpha$ -amylasou a gluukoamylasou může být monitorována před a po jejím průběhu metodou infračervené spektroskopie, kdy lze současně stanovit aktivitu obou zúčastněných enzymů. Intenzita výsledného rozdílu spektra je přímo úměrná enzymové aktivitě<sup>50</sup>. Hydrolyza škrobu katalyzovaná oběma enzymy je monitorována ve střední oblasti infračerveného spektra pomocí Fourierových transformací spektroskopické detekce. Předností amyloklastických metod oproti metodám sacharogenním je rychlost, jednoduchost a v neposlední řadě možnost dosažení vysokého stupně přesnosti a přesnosti. Proces je aplikovatelný ke stanovení aktivity amylasy v krvi a moči bez změny základní techniky. Ve srovnání s metodami sacharogenními však nastávají problémy při výběru vhodného substrátu. Používaná koncentrace škrobu je suboptimální a zdánlivá aktivita amylasy se může lišit v závislosti na zdroji použitého škrobu<sup>51</sup>.

### 8.2. Metody sacharogenní

Sacharogenní metody stanovují množství vznikajících redukcujících sacharidů nejčastěji maltosy nebo glukosy, popřípadě dextrinů vzniklých enzymovým štěpením. Pro stanovení redukcujícího cukru maltosy lze využít spektrofotometrickou<sup>52</sup> metodu, při níž vzniká reakcí s 3,5-dinitrosalicilovou kyselinou cihlově červený komplex, který má absorpční maximum při 540 nm. Metoda byla automatizována, umožňuje stanovení až 60 vzorků za hodinu a našla uplatnění v analýze potravin. Nevýhodou těchto měření je interference endogenní glukosy, která se může v biologických vzorcích vyskytovat. Proto byla navržena metoda, kde se glukosa v roztoku po enzymové reakci  $\alpha$ -amylasy rozkládá za přítomnosti dvou enzymů<sup>53</sup> glukosaoxidasy a katalasy. Glukosaoxidasa přemění glukosu na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku. Peroxid vodíku je ze směsi odstraněn enzymem katalasou. Vzniklá směs je poté dialyzována a redukcující oligosacharidy, především maltosa, reagují s roztokem činidla měď-neocuproin (2,9-dimethyl-1,10-fenantrolinhydrochlorid) při 95 °C po dobu 3 min. Vzniká barevný komplex, jehož absorbance je měřena při 450 nm. Uvedená metoda byla dále modifikována<sup>54</sup> pro zvýšení přesnosti, citlivosti a zvýšení počtu analyzovaných vzorků. Nishidate a Miwa<sup>55</sup> eliminovali vliv endogenní glukosy v krevním séru úpravou vzorku s glukosaoxidasou a hexokinásou. Glukosaoxidasa katalyzuje oxidaci glukosy a vznikající peroxid vodíku reaguje s *N*-ethyl-*N*-sulfopropyl-*m*-toluidinem za katalýzy peroxidasou, vzniká bezbarvá sloučenina. Další část glukosy je přeměněna na glukoso-6-fosfát pomocí hexokinasy a ATP. Hexokinasa je pak inaktivována lipolanem. Lipolan jako

inhibitor hexokinasy neovlivňuje aktivitu  $\alpha$ -amylasy až do koncentrace 250 mg l<sup>-1</sup>.

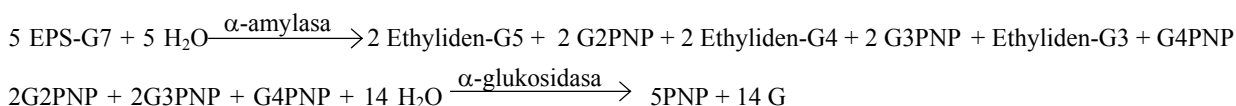
### 8.3. Metody chromogenní

Chromogenní metody využívají tvorbu barevného produktu, který vznikne po hydrolýze polysacharidového substrátu, který je značen chromogenem. Využívají se substráty značené 4-nitrofenolem, který je navázán na konec definovaného oligosacharidu, např. maltopentaosu nebo maltotetraosu<sup>56</sup>. Nejčastěji se využívá  $\alpha$ -D-maltoheptaosid označovaný jako G7, který po konjugaci se 4-nitrofenolem označujeme jako 4-NP-G7. Amylasy štěpí tento substrát na nižší oligosacharidy s navázaným 4-nitrofenolem. Přidá-li se do směsi  $\alpha$ -glukosidasa, tyto jsou dále štěpeny na volné oligosacharidy, 4-nitrofenol a glukosu. Volný 4-nitrofenol absorbuje ve formě anionu při 405 nm. Kombinovaným působením obou enzymů na substrát vzniká více než 30 % volného 4-nitrofenolu.  $\alpha$ -Glukosidasa reaguje převážně s oligosacharidy, které mají v řetězci méně než čtyři molekuly glukosy. Stabilitu reakční směsi lze zlepšit tzv. blokovanými substráty<sup>57</sup>. Jedná se o 4-nitrofenylglykosidy s kovalentně navázanou blokující skupinou (4,6-ethyliden nebo 3-ketobutyliden) na neredukujícím konci oligosacharidu, která chrání řetězce před účinkem exoamylolytické aktivity (před  $\alpha$ -glukosidasou, která je jako pomocný enzym přítomna v reakční směsi). Princip metody znázorňuje schéma 1.

Takto modifikované substráty eliminují vliv endogenní glukosy a pyruvátu.

### 8.4. Metody s biosenzorem

Biosenzory – analytická zařízení s citlivou biorekogniční vrstvou umožňují stanovení aktivity  $\alpha$ -amylasy. Princip metody vychází většinou z metod sacharogenních využívajících při katalýze  $\alpha$ -amylasy vznik oligosacharidů. Obvykle se pomocí biosenzoru stanovuje množství maltosy, která je konečným produktem při hydrolýze škrobů. Filipiak<sup>58</sup> využil ke stanovení aktivity  $\alpha$ -amylasy kyslíkové elektrody, kterou pokryl enzymovou membránou s  $\alpha$ -glukosidasou (štěpí maltosu na dvě molekuly glukosy) a glukosaoxidasou. Spotřeba kyslíku je pak úměrná aktivitě  $\alpha$ -amylasy.  $\alpha$ -Amylasová aktivita byla stanovena v lidském séru pomocí oligosachariddehydrogenasové grafitové elektrody<sup>59</sup> obsahující benzochinon. Přídavek  $\alpha$ -glukosidasy do roztoku obsahujícího maltopentaosu a lidské sérum vytváří proud odpovídající aktivitě enzymu. V nedávné době byl konstruován průtokový biosenzor pro stanovení aktivity slinné amylasy, který obsahoval předkolonu<sup>60</sup>, ve které byla imobilizována  $\alpha$ -glukosidasa štěpící vznikající maltosu na dvě molekuly glukosy, jejíž koncentrace byla poté stanovena na peroxidové elektrodě s glukosaoxidasou. Pro zjišťování vlivu barevných inhibitorů jako jsou benzo[c]fenantridinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin byl konstruován biosenzor, jehož součástí nebyla předkolona<sup>61,62</sup>. Štěpení škrobu  $\alpha$ -amylasou probíhalo konstantní dobu, poté byla aktivita enzymu (vzniklá maltosa) stanovena pomocí peroxidové elektrody, která byla překryta enzymovou membránou s  $\alpha$ -glukosidasou, mutarotasou a glukosaoxidasou. Vliv škrobového substrátu na stanovení byl eliminován použitím tohoto substrátu jako nosného roztoku. Princip je zřejmý ze schématu 2.



(EPS-G7 = 4,6-ethyliden-(G7)-*p*-nitrofenol-(G1)- $\alpha$ -D- maltoheptaosid, PNP = *p*-nitrofenol, G = glukosa)

Schéma 1

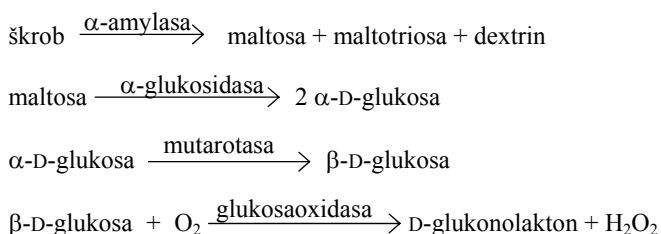


Schéma 2

## 9. Závěr – význam amylas

Amylasy patří mezi enzymy, jejichž funkce byly známy velmi dávno. V roce 1833 zjistil francouzský chemik<sup>63</sup> Anselme Payen, že hrubě vyčištěný extrakt z klíčků ječmene urychluje štěpení škrobu na jeho cukerné složky. Z hrubě vyčištěného extraktu izoloval první enzym v koncentrované podobě diastasu. Švédský chemik<sup>64</sup> Jon Jakob Berzelius o dva roky později názorně dokázal, že škrob může být efektivněji rozštěpen pomocí sladu než kyselinou sírovou a nazval tento jev katalýzou. Z těchto pokusů vyvodil obecný závěr, že chemická katalýza je oním trikem, kterým živé bytosti řídí ve svém organismu chemické přeměny. O tomto názoru se pak během 19. století vedly spory. Dnes je biochemická katalýza samozřejmým základem celé biochemie a molekulární biologie. Biologickými katalyzátory však nejsou chemické prvky, ale složitě vystavěné bílkovinné makromolekuly, které v mnoha případech obsahují atomy kovů. Tyto katalyzátory jsou známy pod pojmem enzymy.

Protože nejdůležitější složkou výživy „západního světa“ je polysacharid škrob, je zřejmý primární význam enzymu  $\alpha$ -amylasy jako katalyzátoru, který umožňuje štěpit škrob v potravinách do podoby, aby byla využitelná v organismu. Amylasy jsou tvořeny v lidském těle v pankreatu a slinných žlázách. Na trhu se v posledních letech objevila celá řada komerčních preparátů, různých potravinových doplňků, které v sobě zahrnují sadu enzymů pro správnou funkci těla. Například firma<sup>65</sup> „Zest for life“ nabízí suplementy, které obsahují enzymové preparáty proteas, amylas, lipas a laktas.

S objevením proteinových inhibitorů  $\alpha$ -amylas souvisí vývoj a nabídka dalších potravinových doplňků, které inhibují aktivitu  $\alpha$ -amylas přímo v tenkém střevě a tím snižují množství přijatých sacharidů do organismu. Na tomto principu se dnes prodává řada komerčních preparátů<sup>66</sup> (Phaseolamin 2250<sup>TM</sup>, Phase'oLean Forte aj.), kde účinná látka se nachází ve formě tablet, kapslí, práškového nápoje či žvýkací gummy a konzumuje se společně se škrobovou potravou. Tyto suplementy mají význam při léčbě cukrovky nebo se uplatňují v rámci různých dietních programů sledujících redukci hmotnosti. Inhibitory  $\alpha$ -amylas a proteas přítomné v semenech a vegetativních částech rostlin chrání rostliny před působením hmyzu. Cílem studia těchto inhibitorů je tvorba transgenních rostlin<sup>19</sup> odolných vůči fytopatogenům.

Při onemocnění pankreatu nebo slinných žláz nastává v lidském organismu změna ve fyziologické aktivitě  $\alpha$ -amylasy, a právě monitorování hladiny aktivity  $\alpha$ -amylasy v klinické biochemii vede k odhalení a potvrzení diagnózy určitého onemocnění těchto orgánů. Aktivitu  $\alpha$ -amylasy je potřeba sledovat také v mnoha průmyslových odvětvích jako je průmysl textilní, potravinářský, výroba pracích prášků apod. Z toho důvodu se stále zdokonalují metody stanovení aktivity  $\alpha$ -amylasy. Využívají se většinou stávající principy, ale aplikují se na nové instrumentální metody a nové přístroje s využitím počítačového zpracování vý-

sledků. Většinou jsou metody nabízeny s možností automatizace.

*Autoři tímto děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM 6198959216.*

## LITERATURA

1. Voet D., Voet J. G., Pratt Ch. W.: *Fundamentals of Biochemistry. Life at the Molecular Level*. Wiley, 2005.
2. McKee T., McKee J. R.: *Biochemistry. An Introduction*. Wm. C. Brown Publisher, Boston 1996.
3. Pandey A., Nigam P., Soccol C. R., Soccol V. T., Singh D., Mohan R.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 135 (2000).
4. Rendleman J. A. Jr.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 171 (2000).
5. Beaupoil-Abadie B., Raffalli M., Cozzone P., Marchis-Mouren G.: *Biochim. Biophys. Acta* 297, 436 (1973).
6. Conway R. L., Hood L. F.: *Stärke* 28, 341 (1976).
7. Vallee B. L., Stein E. A., Sumerwell W. N., Fischer E. H.: *J. Biol. Chem.* 234, 2901 (1959).
8. Levitzki A., Steer M.: *Eur. J. Biochem.* 41, 171 (1974).
9. Walker G. J., Hope P. M.: *Biochem. J.* 86, 452 (1963).
10. Bayer G. D., Luo Y., Withers S. G.: *Protein Sci.* 4, 1730 (1995).
11. Darnall W., Birnbaum R.: *Biochemistry* 12, 3489 (1973).
12. <http://www.expasy.ch/enzyme>, staženo 10.10.2005
13. Marshall J. J., Lauda C. M.: *J. Biol. Chem.* 250, 8030 (1975).
14. Choudhury A., Maeda K., Murayama R., DiMaggio E. P.: *Gastroenterology* 111, 1313 (1996).
15. Boivin M., Zinsmeister A. R., Go V. L., DiMaggio E. P.: *Mayo Clin. Proc.* 62, 249 (1987).
16. Boivin M., Flourie B., Rizza R. A.: *Gastroenterology* 94, 387 (1988).
17. Lankisch M., Layer P., Rizza R. A., DiMaggio E. P.: *Pancreas* 17, 176 (1998).
18. Holt P. R., Thea D., Yang M. Y., Kotler D. P.: *Metabolism* 37, 1163 (1988).
19. Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Grossi-de-Sá M. F.: *Eur. J. Biochem.* 269, 397 (2002).
20. Ryan C. A.: *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 425 (1990).
21. Ryan C. A., Pearce G.: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 1 (1998).
22. Bishop J. G., Dean A. M., Mitchell-Olds T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5322 (2000).
23. Sales M. P., Gerhardt I. R., Grossi-de-Sá M. F., Xavier-Filho J.: *Plant Physiol.* 124, 515 (2000).
24. Konarev A. V.: *Euphytica* 92, 89 (1996).
25. Chrispeels M. J., Grossi-de-Sá M. F., Higgins T. J. V.: *Seed Sci. Res.* 8, 257 (1998).
26. Gatehouse A. M. R., Gatehouse J. A.: *Pest. Sci.* 52, 165 (1998).
27. Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Bloch Jr. C.,

- Silva C. P., Grossi de-Sá M. F.: *Eur. J. Biochem.* 267, 1466 (2000).
28. Abe J. I., Sidenius U., Svensson B.: *Biochem. J.* 293, 151 (1993).
  29. Bloch Jr. C., Richardson M.: *FEBS Lett.* 279, 101 (1991).
  30. Iulek J., Franco O. L., Silva M., Slivinski C. T., Bloch Jr. C., Rigden D. J., Grossi de-Sá M. F.: *Int. J. Biochem. Cell Physiol.* 32, 1195 (2000).
  31. Yamagata H., Kunimatsu K., Kamasaka H., Kuramoto T., Iwasaki T.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 62, 978 (1998).
  32. Melo F. R., Sales M. P., Silva L. S., Franco O. L., Bloch C. Jr., Ary M. B.: *Prot. Pept. Lett.* 6, 387 (1999).
  33. Grossi de-Sá M. F., Mirkov T. E., Ishimoto M., Colucci G., Bateman K. S., Chrispeels M. J.: *Planta* 203, 295 (1997).
  34. Young N. M., Thibault P., Watson D. C., Chrispeels M. J.: *FEBS Lett.* 446, 203 (1999).
  35. Feng G. H., Richardson M., Chen M. S., Kramer K. J., Morgan T. D., Reeck G. R.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 419 (1996).
  36. Kasahara K., Hayashi K., Arakawa T., Philo J. S., Wen J., Hara S., Yamaguchi H.: *J. Biochem.* 120, 177 (1996).
  37. Shaw J. F., Lin F. P., Chen S. Ch., Chen H. Ch.: *Bot. Bull. Acad. Sin.* 36, 195 (1995).
  38. Racek J.: *Klinická biochemie*. Galén, Praha 1999.
  39. Wohlgemuth J.: *Biochem. Z.* 9, 1 (1908).
  40. Somogyi M.: *J. Biol. Chem.* 125, 299 (1938).
  41. Babson A. L., Tenney S. A., Meglaw R. E.: *Clin. Chem.* 16, 39 (1970).
  42. Street H. V., Close J. R.: *Clin. Chim. Acta* 1, 256 (1956).
  43. Pimstone N. R.: *Clin. Chem.* 10, 891 (1964).
  44. Gomori G.: *Am. J. Clin. Pathol.* 27, 714 (1957).
  45. Hirokado M., Hirata K., Uematsu Y., Sadamasu Y., Ito K., Suzuki S.: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 38, 341 (1997).
  46. Swanson M. A.: *J. Biol. Chem.* 172, 825 (1948).
  47. Malkus H., Ibanez J., Castro A., DiCesare J. L.: *Clin. Chem.* 23, 122 (1977).
  48. Shipe J. R., Savory J.: *Clin. Chem.* 18, 1323 (1972).
  49. Zinterhofer L., Wardlaw S., Jatlow P., Seligson D.: *Clin. Chim. Acta* 43, 5 (1973).
  50. Schindler R., Lendl B., Kellner R.: *Anal. Chim. Acta* 366, 35 (1998).
  51. Somogyi M.: *Clin. Chem.* 6, 23 (1960).
  52. van Staden J. F., Mulaudzi L. V.: *Anal. Chim. Acta* 421, 19 (2000).
  53. O'Neal W. R., Gochman N.: *Clin. Chem.* 16, 985 (1970).
  54. Matthews W. S., Sterling R. E., Boyd T., Flores O. R.: *Clin. Chem.* 19, 1384 (1973).
  55. Nishidate K., Miwa S.: *Jpn. J. Clin. Pathol.* 29, 259 (1981).
  56. Rauscher E., Neumann E. S., Bulow S., Wahlefeld A. W.: *Clin. Chem.* 31, 14 (1985).
  57. Kruse-Jarres J. D., Kaiser C., Hafkenschied J. C., Hohenwallner W., Stein W., Bohner J.: *J. Clin. Chem. Biochem.* 27, 103 (1998).
  58. Filipiak M., Fludra K., Gošćimińska E.: *Biosens. Bioelectron.* 11, 355 (1996).
  59. Kinoshita H., Usui T., Kaneda Y., Ikeda T.: *Bunseki Kagaku* 41, 145 (1992).
  60. Yamaguchi M., Kanemaru M., Kanemori T., Mizuno Y.: *Biosens. Bioelectron.* 18, 835 (2003).
  61. Zajoncová L., Kosina P., Vičar J., Ulrichová J., Peč P.: *J. Enzyme Inhib.* 20, 261 (2005).
  62. Zajoncová L., Jilek M., Beranová V., Peč P.: *Biosens. Bioelectron.* 20, 240 (2004).
  63. <http://www.britannica.com/eb/article-9058831>, staženo 10.10.2006.
  64. <http://www.anbio.org.br/english/worksh52.htm>, staženo 10.10.2006.
  65. <http://www.anyvitamins.com>, staženo 10.10.2006.
  66. <http://naturalproductsinsider.com/articles/1a1braning1.html>, staženo 10.10.2006.

**L. Zajoncová and M. Šebela** (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc*): **Amylases – Significance of Determination of their Activity**

$\alpha$ -Amylases (EC 3.2.1.1), catalyzing the hydrolysis of  $\alpha$ -1,4-D-glucan linkages in starch, are widely distributed in nature, being found in bacteria, plants and animals. Starch is the most extensively used polysaccharide in the diet of the Western world. Starch digestion occurs primarily in the small intestine, where two families of degradation enzymes are found. The first family is introduced into the intestinal lumen and is represented by  $\alpha$ -amylases – salivary and pancreatic. Members of the other family (including disaccharidases) are immobilized on the brushborder membrane. Amylase activity assays in blood serum are useful as a diagnostic tool, because markedly elevated serum amylase levels are associated with pancreatitis. There are two most common procedures for the determination of  $\alpha$ -amylase activity: amyloclastic and saccharogenic. Many other methods have been introduced, in which either soluble or insoluble chromogenic substrates for  $\alpha$ -amylase are used. Recently, a biosensor for  $\alpha$ -amylase activity assay was constructed, based on the determination of  $\alpha$ -amylase-generated maltose using a peroxide electrode with glucose oxidase,  $\alpha$ -glucosidase and mutarotase immobilised on a cellophane membrane. The biosensing method offers a great advantage over traditional spectrophotometry because it is highly sensitive and there is no interference of coloured compounds. Some plants, particularly wheat and beans, contain specific inhibitors of animal  $\alpha$ -amylase. The use of these inhibitors can help to improve carbohydrate tolerance in diabetics and aid in weight control. The inhibitors may also find application in imparting pest resistance to crop plants.