UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
KATEDRA BIOCHEMII I FIZJOLOGII ZWIERZĄT
Zakład Biochemii
20-033 Lublin, ul. Akademicka 12
tel. 081 445 69 73

Kinetyka enzymatyczna

Zadanie 1. Badanie wpływu stężenia enzymu na szybkość reakcji enzymatycznej

Celem zadania jest obserwacja wpływu stężenia oraz czasu działania enzymu na szybkość hydrolizy sacharozy przy udziale inwertazy.

Zasada oznaczania

Inwertaza (sacharoza) należy do hydrolaz rozszczepiających wiązanie glikozydowe w sacharozie, rozkładając ją do glukozy i fruktozy. Proces ten nazywa się inwersją, stąd druga nazwa enzymu. Optymalne pH działania tego enzymu to 4-7, a przy pH = 10 jest on zupełnie nieaktywny.

Aktywność inwertazy można mierzyć metodą na wykrywanie cukrów redukujących, ponieważ w miarę postępu hydrolizy wzrasta w roztworze stężenie cukrów prostych (glukozy i fruktozy)

Celem ilościowego oznaczenia ilości powstałego w procesie utleniania cukrów tlenku miedzi I przeprowadza się reakcję z odczynnikiem fosforomolibdenowym, co prowadzi do jego redukcji do błękitu molibdenowego. Natężenie błękitnej barwy jest proporcjonalne do ilości cukru redukującego.

Wykonanie

Do 10 ponumerowanych probówek odmierzyć kolejno 1 cm^3 odczynnika miedziowego, 0,7 cm^3 wody destylowanej i 0,1 cm^3 0,05 mol/dm^3 NaOH.

Do probówki 1 dodać 0,2 cm^3 enzymu nierozcieńczonego.

Do probówki 6 dodać 0,1 cm^3 enzymu nierozcieńczonego wodą destylowaną i 0,1 cm^3 wody destylowanej.

Ten zestaw służy do wizualizacji efektów działania enzymu podczas reakcji. Probówka 1 stanowi kontrolę dla probówek 2, 3, 4 i 5 dla enzymu nierozcieńczonego, a probówka 6 – dla serii z enzymem rozcieńczonym, probówek 7, 8, 9 i 10.

W probówce A przygotować układ inkubacyjny składający się z 1 cm^3 0,8 mol/dm^3 sacharozy podgrzanej do temp. 37°C oraz 1 cm^3 roztworu enzymu. Probówkę natychmiast wstawić do łaźni wodnej o temp. 37°C i zanotować czas „0" – tj. moment zmieszania substratu z enzymem. Należy pamiętać, że stężenie substratu po dodaniu enzymu jest o połowę niższe.

Po 5, 10, 20 i 30 min inkubacji pobierać z probówki A po 0,2 cm^3 inkubatu do wcześniej przygotowanych probówek z odczynnikiem miedziowym: po 5 min do 2, po 10 min do 3, po 20 min do 4, a po 30 min do 5 probówki.

W probówce B przygotować układ inkubacyjny składający się z 1 cm^3 0,8 mol/dm^3 sacharozy podgrzanej do temp. 37°C oraz 0,5 cm^3 wody destylowanej i 0,5 cm^3 roztworu enzymu (otrzymamy enzym dwukrotnie rozcieńczony). Probówkę natychmiast wstawić do łaźni wodnej o temp. 37 C i zanotować czas „0”.

Po 5, 10, 20 i 30 min inkubacji pobierać z probówki B po 0,2 cm^3 inkubatu do wcześniej przygotowanych probówek z odczynnikiem miedziowym: po 5 min do 7, po 10 min do 8, po 20 min do 9, a po 30 min do 10 probówki.

Po zakończeniu inkubacji wszystkie probówki z odczynnikiem miedziowym (10 sztuk) ogrzać przez 8 min we wrzącej łaźni wodnej, ochłodzić, a następnie dodać do wszystkich probówek po 1 cm^3 odczynnika fosforomolibdenowego. Dokładnie wymieszać, rozcieńczyć ich zawartość w zależności od intensywności barwy, i mierzyć w spektrokolorymetrze przy długości fali 610 nm absorbancję próby 2, 3, 4 i 5 wobec próby 1, a absorbancję prób 7, 8, 9, 10 wobec próby 6.

Wykreślić krzywą zależności wartości absorbancji od czasu działania i stężenia enzymu.