

## Wpływ stężenia substratu (stała Michaelisa) na szybkość hydrolizy sacharozy

### 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 7 probówek odmierzyć kolejno 0,5 cm<sup>3</sup> odczynnika miedziowego, 0,7 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i 0,1 cm<sup>3</sup> 0,05M NaOH.

Do probówki nr 1 dodać 0,1 cm<sup>3</sup> enzymu i 0,1 cm<sup>3</sup> wody destylowanej - jest to ślepa próba do oznaczeń kolorymetrycznych.

Następnie przygotować 6 probówek oznaczonych:  
A, B, C, D, E, F i do nich odmierzyć:

- A** - 1 cm<sup>3</sup> **0,8M** sacharozy
- B** - 1 cm<sup>3</sup> **0,6M** sacharozy
- C** - 1 cm<sup>3</sup> **0,5M** sacharozy
- D** - 1 cm<sup>3</sup> **0,4M** sacharozy
- E** - 1 cm<sup>3</sup> **0,3M** sacharozy
- F** - 1 cm<sup>3</sup> **0,1M** sacharozy

Probówki te wstawić do łaźni wodnej o temp. 37° C, po 5 minutach dodać do każdej probówki 1 cm<sup>3</sup> roztworu enzymu (inwertazy). Zanotować czas „0” tj. czas, w którym dodano do substratów enzymu (należy pamiętać, że stężenie substratów po dodaniu enzymu jest o połowę niższe).



Po 15 min. Inkubacji w łaźni wodnej przenieść z probówki:

- A** - 0,2 cm<sup>3</sup> inkubatu do probówki **nr 2**
- B** - 0,2 cm<sup>3</sup> inkubatu do probówki **nr 3**
- C** - 0,2 cm<sup>3</sup> inkubatu do probówki **nr 4**
- D** - 0,2 cm<sup>3</sup> inkubatu do probówki **nr 5**
- E** - 0,2 cm<sup>3</sup> inkubatu do probówki **nr 6**
- F** - 0,2 cm<sup>3</sup> inkubatu do probówki **nr 7**

Wszystkie te probówki (tzn.1,2,3,4,5,6,7) ogrzać przez 8 min. we wrzącej łaźni wodnej. Ochłodzić, a następnie dodać do każdej probówki 1cm<sup>3</sup> odczynnika fosforomolibdenowego. Każdą próbę rozcieńczyć ok. 10x wodą destylowaną (po konsultacji z asystentem). Oznaczyć absorbancję na kolorymetrze przy długości fali 610nm. Wyniki zanotować w tabeli.

Nr próbówki	2	3	4	5	6	7
Końcowe stężenie substratu w mieszaninie inkubacyjnej	0.4	0.3	0.25	0.2	0.15	0.05
Absorbancja (A)						

### Obliczenie wyników

- Wykreślić krzywą zależności A i stężenia substratów po 15min.
- Wyznaczyć stałą Michaelisa

