

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 fosfomolibdenowym, co prowadzi do jego redukcji do błękitu molibdenowego. Natężenie błękitnej barwy jest proporcjonalne do ilości cukru redukującego.

Wykonanie

Przygotować 7 probówek oznaczonych 1-7 i odmierzyć kolejno: 0,7 cm³ wody destylowanej, 0,5 cm³ odczynnika miedziowego oraz 0,1 cm³ NaOH (0,05 M).

Do probówki nr 1 dodać 0,1 cm³ enzymu i 0,1 cm³ wody destylowanej - jest to ślepa próba do oznaczeń kolorymetrycznych.

Następnie przygotować 6 probówek oznaczonych od A do F i odmierzyć do nich:

- A – 1 cm³ **0,8M** sacharozy
- B – 1 cm³ **0,6M** sacharozy
- C – 1 cm³ **0,5M** sacharozy
- D – 1 cm³ **0,4M** sacharozy
- E – 1 cm³ **0,3M** sacharozy
- F – 1 cm³ **0,1M** sacharozy

Probówki te wstawić do łaźni wodnej (37°C, 5 min). Po tym czasie dodać do każdej probówki 0,1 cm³ roztworu enzymu (inwertazy) i zamieszać. 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 cm³ inkubatu do probówki nr 2
- B – 0,2 cm³ inkubatu do probówki nr 3
- C – 0,2 cm³ inkubatu do probówki nr 4
- D – 0,2 cm³ inkubatu do probówki nr 5
- E – 0,2 cm³ inkubatu do probówki nr 6
- F – 0,2 cm³ inkubatu do probówki nr 7

Próbówki 1-7 ogrzać przez 8 min. we wrzącej łaźni wodnej (zatrzymanie reakcji enzymatycznej i przyspieszenie reakcji glukozy z jonami miedzi). Ochłodzić pod bieżącą wodą, a następnie dodać do każdej probówki 1 cm³ odczynnika fosforomolibdenowego.

Każdą próbkę należy rozcieńczyć około 10-krotnie wodą destylowaną (po uprzedniej konsultacji z prowadzącym). Następnie zmierzyć absorbancję próbek 2-7 względem próbki 1 (kontroli) przy długości fali 610 nm. Wyniki pomiarów należy 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 absorbancji od stężenia substratu.
- Wyznaczyć stałą Michaelisa.

