

Kinetyka enzymatyczna

Zadanie 1. Badanie wpływu stężenia enzymu oraz czasu reakcji 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 cm³ odczynnika miedziowego, 0,7 cm³ wody destylowanej, 0,1 cm³ 0,05 mol/dm³ NaOH. Zawartość dokładnie wymieszać. Do probówki 1 dodać 0,2 cm³ enzymu, a do probówki 6 dodać 0,1 cm³ enzymu i 0,1 cm³ wody destylowanej. Wymieszać. Zestaw służy do wizualizacji efektów działania enzymu podczas reakcji. Probówka 1 stanowi kontrolę dla probówek 2, 3, 4 i 5 dla enzymu nierozcieńczonego (A), a probówka 6 kontrole dla probówek 7, 8, 9 i 10 dla enzymu rozcieńczonego (B).

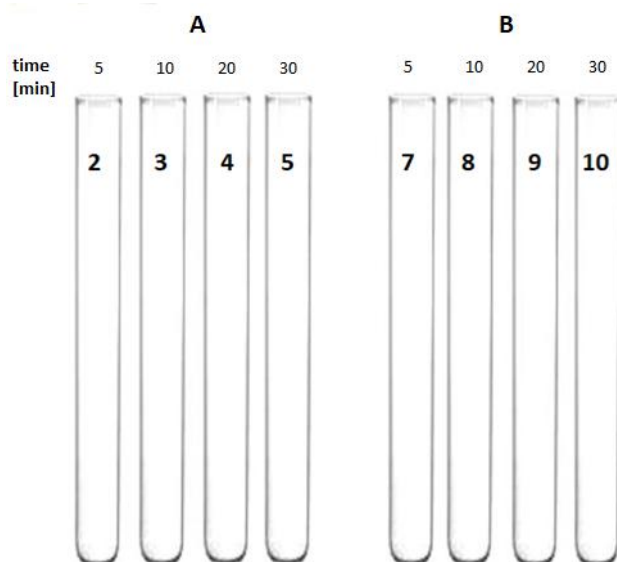
W dwóch osobnych probówkach przygotować układy inkubacyjne: **A** i **B** (enzym w 2 różnych stężeniach). Do probówki A i B odmierzyć po 1 cm³ 0,8 mol/dm³ sacharozy i wstawić do łaźni wodnej o temp. 37°C. Po 5 minutach, do probówki A dodać 0,2 cm³ enzymu, a do probówki B - 0,1 cm³ enzymu i 0,1 cm³ wody destylowanej (uzyskując dwukrotne rozcieńczenie). Wymieszać i zanotować czas „0”.

Uwaga! Moment zmieszania enzymu z substratem rozpoczyna reakcję enzymatyczną (czas „0”). Przez cały czas trwania reakcji probówki muszą znajdować się w łaźni wodnej (37°C). Należy pamiętać, że po zmieszaniu składników stężenie substratu ulega dwukrotnemu obniżeniu.



Po upływie 5, 10, 20 i 30 minut pobierać z probówek A i B po 0,2 cm³ inkubatu do wcześniej przygotowanych probówek z odczynnikiem miedziowym. Inkubat z układu A przenosić kolejno do probówek nr 2, 3, 4 i 5, natomiast z układu B do probówek nr 7, 8, 9 i 10.

Uwaga! Po każdym dodaniu inkubatu należy wymieszać.



Po zakończeniu inkubacji wszystkie 10 probówek z odczynnikiem miedziowym ogrzewać przez 8 minut we wrzącej łaźni wodnej w celu dezaktywacji enzymu i przyspieszenia reakcji redukcji jonów miedzi(II).

Uwaga! Należy wcześniej uruchomić płytę grzejną, aby doprowadzić wodę do wrzenia. Podczas ogrzewania uważać, aby woda nie dostała się do wnętrza probówek.

Po tym czasie ochłodzić zawartość probówek, a następnie do wszystkich dodać po 0,9 cm³ odczynnika fosfomolibdenowego. Dokładnie wymieszać. W zależności od intensywności powstałego zabarwienia, roztwory odpowiednio rozcieńczyć. Dokonać pomiaru absorbancji przy długości fali 610 nm, mierząc próby 2, 3, 4 i 5 względem kontroli nr 1, a próby 7, 8, 9 i 10 względem kontroli nr 6.



Wykreślić krzywą zależności wartości absorbancji od czasu działania i stężenia enzymu (absorbancja na osi Y, a czas działania enzymu oraz na osi X), 2 krzywe dla dwóch różnych stężeń enzymu na jednym wykresie.

