|  |  |
| --- | --- |
| **jména:** | |
| **obor:** | **datum provedení:** |

**přílohy protokolu:** 2× graf: kalibrační přímka pro stanovení koncentrace maltosy Somogyiho-Nelsonovou metodou, závislost rychlosti α-amylasové reakce na pH prostředí

**OKRUHY K PŘÍPRAVĚ**

Redukující a neredukující sacharidy. α-amylasová reakce, princip měření α-amylasové aktivity. Rychlost enzymové reakce, aktivita enzymu. Specifická aktivita enzymu. Vliv pH na rychlost enzymové reakce. Chemické výpočty.

**Návod v plném znění platí pro obory molekulární biologie, chemie, biochemie (pětihodinová a sedmihodinová cvičení).**

**Biologické obory kromě molekulární biologie (tříhodinová cvičení): jen část A.**

**Učitelské kombinace (čtyřhodinová cvičení): kalibrační křivka pro stanovení koncentrace maltosy (z části A) + část B.**

PRINCIP ÚLOHY

**A. Stanovení aktivity α-amylasy**

***α-amylasa*** (ptyalin, diastasa, systematický název: 1,4-α-D-glukan-glukanohydrolasa) katalyzuje hydrolýzu 1,4-α-D-glykosidické vazby škrobu (amylosy nebo amylopektinu) a glykogenu. Je aktivována chloridovými, bromidovými nebo jodidovými anionty, rovněž vyžaduje přítomnost vápenatých kationtů. Meziprodukty α-amylasovéreakce jsou různé oligosacharidy (dextriny), konečným produktem je disacharid maltosa:



*H2O*

*škrob 🡒 n . maltosa*

**Maltosa** (4-*O*-α-D-glukopyranosyl-D-glukopyranosa) je redukující disacharid skládající se z glukosových podjednotek spojených vazbou jedné alkoholické a jedné poloacetalové hydroxylové skupiny. Zatímco druhá poloacetalová hydroxylová skupina zůstává volná a propůjčuje maltose redukující vlastnosti. Množství maltosy vzniklé α-amylasovou reakcí lze na základě jejích redukujících vlastností stanovit metodou podle Somogyiho.

Slinné žlázy vylučují sekret (0,5 až 1,5 l denně) obsahující stopová množství řady enzymů (např. cholinesterasu, různé typy proteinas a glykosidas). Vysokou aktivitu však vykazuje především slinná α-amylasa (je isoenzymem pankreatické α-amylasy), která má fyziologický význam v procesu trávení – hydrolyzuje až 70 % škrobu přijatého potravou. α-amylasa je jediný trávicí enzym, který se vyskytuje ve slinách (pro trávení potravy obsahující škrob má však větší význam pankreatická α-amylasa). Aktivita slinné α-amylasy může být stanovena i v krevním séru, což má diagnostický význam – její aktivita v séru je zvýšena při zánětu příušních slinných žláz (příušnice). Specifická aktivita slinné α-amylasy se však u dvou různých zdravých jedinců může lišit více než desetinásobně.

**Rychlost enzymové reakce** lze definovat jako změnu koncentrace substrátu *c* (mol/l) za čas *t* (s) podle vzorce: ***v* [mol·s−1·l-1] = d*c*/d*t***.

**Enzymová aktivita (mol s−1)** je definována jako limitní rychlost enzymové reakce za definovaných podmínek: saturace enzymu substrátem, pH a teplotní optimum. Aktivitu lze vypočítat vynásobením limitní rychlosti enzymové reakce objemem reakční směsi.

**Základní jednotkou enzymové aktivity je katal (kat)**, což je taková aktivita enzymu, která přemění 1 mol látky za sekundu **(kat = mol/s)**. Pro praxi je tato jednotka příliš vysoká, aktivita enzymu se obvykle vyjadřuje v jednotkách μkat (μmol přeměněné látky za sekundu) nebo nkat (nmol přeměněné látky za sekundu). Další možností jak vyjadřovat enzymovou aktivitu je enzymová jednotka (U), která je definována jako μmol/min.

**Specifická aktivita enzymu** je aktivita vztažená k hmotnosti celkového proteinu např. (kat/mg).

Aktivita slinné α-amylasybude v této úloze stanovena pomocí rychlost vzniku maltosy během α-amylasové reakce.

**B. pH optimum α-amylasy**

Rychlost enzymové reakce závisí na pH. Tato závislost je dána ionizací aminokyselinových zbytků vlivem pH podobně jako u jiných bílkovin Tato ionizace ovlivňuje terciární strukturu bílkoviny a při extrémních hodnotách může vést i k denaturaci. Hodnota pH dále ovlivňuje například ionizaci substrátu reakce nebo aminokyselin v aktivním centru. Substrát se například může vázat do aktivního místa pouze v protonovaném stavu. Enzymové reakce probíhají limitní (maximální) rychlostí jen při určitém pH prostředí, v tzv. **oblasti pH optima.** pH optimum téhož enzymu se tedy může lišit i v závislosti na konkrétním použitém substrátu. Většina enzymů má pH optimum v neutrální, slabě kyselé nebo slabě alkalické oblasti, časté jsou však výjimky (např. pepsin má pH optimum v oblasti pH 1,5–2,5, alkalická fosfatasa při pH kolem 9,5).

PRAKTICKÁ ČÁST A. Stanovení aktivity α-amylasy

Materiál a vybavení:

fyziologický roztok (0,9% chlorid sodný) s přídavkem 1 mmol.1-1 chloridu vápenatého

standardní roztok maltosy (0,1 mmol·1−1)

fosfátový pufr (0,15 mol·1−1) pH 7,5

1% roztok škrobu

Somogyiho-Nelsonovo činidlo I (roztok uhličitanu sodného, vínanu sodno-draselného a síranu sodného)

Somogyiho-Nelsonovo činidlo II (roztok síranu měďnatého a síranu sodného)

Somogyiho-Nelsonovo činidlo III (roztok molybdenanu amonného a hydrogenarseničnanu sodného v kyselině sírové)

Lugolův roztok (roztok jódu a jodidu draselného)

*kádinka, pipety, dávkovače, pumpičkové dávkovače, odměrná baňka 10 ml, krátké zkumavky, zátky, Pasteurova pipeta, vortex, stopky, kruhový stojan na zkumavky, hrnec, termostat, fotometr, ledová lázeň*

**V úloze pracujete s toxickými činidly (zejména Somogyiho-Nelsonovo činidlo III) – pracujte se zvýšenou opatrností!**

Postup:

***Sestrojení kalibrační závislosti pro stanovení koncentrace maltosy:*** Nachystejte si sadu 6 zkumavek, které důkladně vypláchnete destilovanou vodou. Podle tabulky připravte sadu šesti roztoků o celkovém objemu 0,5 ml a známé koncentraci maltosy k sestrojení kalibrační přímky (zkumavky 1–6). Zkumavka č. 1 maltosu neobsahuje, proto se použije jako slepý vzorek.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| zkumavka  č. | pipetovaný objem | | vypočtená  *c*(mal)  [mmol·l−1] | *A*740 |
| 0,1 mmol·l−1 roztok mal [ml] | destil. voda  [ml] |
| 1 | 0,0 | 0,5 | 0,00 | 0,000 |
| 2 | 0,1 | 0,4 |  |  |
| 3 | 0,2 | 0,3 |  |  |
| 4 | 0,3 | 0,2 |  |  |
| 5 | 0,4 | 0,1 |  |  |
| 6 | 0,5 | 0,0 |  |  |

*Používejte pouze dokonale čisté pipety a zkumavky. Stanovení je velmi citlivé, jakákoliv stopa redukujících látek hrubě zkresluje jeho výsledek.*

Do všech zkumavek přidejte 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla I, vzorky promíchejte a zahřívejte asi 5 minut na vroucí vodní lázni. Potom přidejte do všech vzorků 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla II a zahřívejte na vroucí vodní lázni dalších 10 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu (lze chladit pomocí studené vody) přidejte do všech vzorků 2 ml Somogyiho-Nelsonova činidla III, vzorky promíchejte a ponechejte stát po dobu nejméně 2 minut při laboratorní teplotě a opět promíchejte (vypuzení oxidu uhličitého ze vzorku).

Změřte absorbanci roztoků 2–6 při vlnové délce 740 nm proti slepému vzorku č. 1 (roztoky po měření vracejte do zkumavek), výsledky zapište do tabulky. Při měření absorbance je potřeba sledovat, zda se v kyvetách netvoří bublinky CO2, které zkreslují měření. V případě výskytu bublinek (CO2) v kyvetách zaťukejte kyvetou jemně o stůl, čímž CO2 vypudíte. Pokud některá z hodnot absorbance překročila 0,8 (nad touto hodnotou již není závislost absorbance na koncentraci lineární – neplatí Lambert-Beerův zákon) je nutné udělat novou kalibrační přímku, případně tuto hodnotu z kalibrace vynechat.

***Příprava enzymového preparátu α-amylasy:*** Do 10ml odměrné baňky odpipetujte 1 ml vlastních slin, obsah doplňte po značku fyziologickým roztokem s přídavkem chloridu vápenatého.

***Stanovení aktivity α-amylasy:***Do 6 krátkých zkumavek (sada A) pipetujte 0,5 ml roztoku škrobu a 2,4 ml fosfátového pufru. Do jedné z nich připipetujte 0,1 ml fyziologického roztoku s přídavkem chloridu vápenatého (její obsah bude sloužit jako kontrola neenzymatického rozkladu škrobu), tuto zkumavku označte A/K (kontrolní vzorek).

Do dalších 6 zkumavek (sada B) dejte 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla I. (Somogyiho-Nelsonovo činidlo I v této sadě zkumavek slouží jednak k ukončení enzymové reakce, jednak ke stanovení vzniklých produktů.) Jednu ze zkumavek označte B/K.

Termostat vytemperujte na teplotu 30 °C. Po ustálení teploty do něj vložte zkumavky sady A a ponechejte temperovat 10 minut. Po uplynutí této doby vložte zkumavky sady B do vroucí vodní lázně.

Zkumavku označenou A/K ponechejte stále v termostatu, uzavřete ji zátkou. Ve zbývajících 5 zkumavkách temperovaných na teplotu 30 °C startujte enzymovou reakci přídavkem 0,1 ml zředěných slin v intervalu 30 s (spusťte stopky, po 30 sekundách startujte přídavkem zředěných slin v první zkumavce, reakční směs promíchejte, stopky nevypínejte, po dalších 30 sekundách startujte přídavkem zředěných slin ve druhé zkumavce, reakční směs promíchejte, stopky nevypínejte, viz tabulka). Přesně po 15 minutách opět v pravidelných intervalech 30 sekund odeberte z každé zkumavky dávkovačem 0,5 ml reakční směsi a pipetujte do zkumavky se Somogyiho-Nelsonovým činidlem I na vroucí vodní lázni (viz tabulka). Dbejte, aby špička pipety zasahovala pod hladinu činidla, nenechávejte vzorek stékat po stěně zkumavky.

Během enzymové reakce zůstávají zkumavky s reakční směsí v termostatu.

Do zkumavky označené písmenem B/K na vroucí vodní lázni přeneste dávkovačem s čistou špičkou (pozor na kontaminaci slepého vzorku slinami) 0,5 ml roztoku ze zkumavky obsahující kontrolní vzorek (zkumavka A/K).

Všechny zkumavky ponechejte ve vroucí vodní lázni asi 3 minuty a pak je nechejte chladnout při laboratorní teplotě.

Po odebrání všech vzorků reakčních směsí a kontrolního vzorku uložte jejich zbytky (nepoužité pro stanovení koncentrace maltosy) do ledové lázně (nevyhazujte je).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| zkumavka  č. | *start reakce*  *(přídavek zředěných slin)*  *- čas na stopkách* | *konec reakce*  *(vnesení vzorku do Somogyiho-*  *Nelsonova činidla I)*  *- čas na stopkách* |
| 1 | 30´´ | 15´30´ |
| 2 | 1´ | 16´ |
| 3 | 1´30´´ | 16´30´´ |
| 4 | 2´ | 17´ |
| 5 | 2´30´´ | 17´30´´ |

***Stanovení koncentrace maltosy v reakčních směsích:*** Do každé zkumavky sady B (obsahující nyní reakční směs nebo kontrolní vzorek a Somogyiho-Nelsonovo činidlo I) přidejte 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla II, jejich obsah promíchejte a ponechejte je na vroucí vodní lázni dalších 10 minut. Pak zkumavky ochlaďte vodou, přidejte do nich 2 ml Somogyiho-Nelsonova činidla III, promíchejte, ponechejte stát po dobu nejméně 2 minut při laboratorní teplotě a opět promíchejte (vypuzení oxidu uhličitého ze vzorku).

|  |
| --- |
|  |

Změřte absorbanci vzorků, v nichž probíhala enzymová reakce, proti kontrolnímu vzorku při vlnové délce 740 nm. Jestliže je kontrolní vzorek zakalený, přefiltrujte jej. Při měření absorbance je potřeba sledovat, zda se v kyvetách netvoří bublinky CO2, které zkreslují měření. V případě výskytu bublinek (CO2) v kyvetách zaťukejte kyvetou jemně o stůl, čímž CO2 vypudíte. Překračují-li absorbance některých vzorků hodnotu 0,8, vzorky definovaným způsobem nařeďte vodou (zvolte vhodné násobné ředění) a znovu změřte proti stejným způsobem zředěnému kontrolnímu vzorku.

Do zbytků reakčních směsí a kontrolního vzorku přidejte pomocí Pasteurovy pipety kapku Lugolova roztoku, promíchejte. Srovnejte zbarvení vzorků, v nichž probíhala enzymová reakce, se zbarvením kontrolního vzorku.

Vyhodnocení:

Vypočítejte koncentrace maltosy ve zkumavkách č. 2–6, výsledky doplňte do tabulky v části Postup. Sestrojte kalibrační graf (závislost *A*740na koncentraci maltosy ve zkumavce).

Uveďte následující údaje a tabulku doplněnou experimentálními a vypočtenými údaji:

- objem reakční směsi (ml):

- doba reakce (min):

- objem neředěných slin obsažených v reakční směsi (ml):

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| zkumavka č. | *A*740 | Ø *A*740 | *c* maltosy  ve vzorku pro fotometrii\*  [mmol·l−1] | ředění  vzorku  pro fotometrii | *c* maltosy v reakční směsi\*\*  [mmol·l−1] |
| 1 |  |  |  |  |  |
| 2 |  |
| 3 |  |
| 4 |  |
| 5 |  |

*\*) při výpočtu koncentrace maltosy použijte kalibrační graf*

*\*\*) koncentrace redukujících sacharidů vynásobená ředěním pro fotometrii*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| *n* maltosy v reakční směsi  [μmol] | aktivita amylasy  [μmol·min−1]\* | specifická aktivita amylasy  [μmol·min−1·ml−1]\*\* |
|  |  |  |
|  | [nkat] | [nkat·ml−1] |
|  |  |

*\*) v celém objemu reakční směsi*

*\*\*) aktivita vztažená na ml slin*

Uveďte zbarvení vzorků (po přídavku Lugolova roztoku), v nichž probíhala enzymová reakce, a zbarvení kontrolního vzorku.

Rozdíl vysvětlete:

Praktická část B. pH optimum α-amylasy

Materiál a vybavení:

0,1mol·l−1 kys. citronová

0,2mol·l−1 Na2HPO4

standardní pufry pH 4, pH 7 a pH 9

fyziologický roztok (0,9% chlorid sodný) s přídavkem 1 mmol·l−1 chloridu vápenatého

1% roztok škrobu

Somogyiho-Nelsonovo činidlo I (roztok uhličitanu sodného, vínanu sodno-draselného a síranu sodného)

Somogyiho-Nelsonovo činidlo II (roztok síranu měďnatého a síranu sodného)

Somogyiho-Nelsonovo činidlo III (roztok molybdenanu amonného a hydrogenarseničnanu sodného v kyselině sírové)

Lugolův roztok (roztok jódu a jodidu draselného)

*pipety, odměrný válec 25 ml, titrační baňky, pH-metr, kádinka, odměrná baňka 10 ml*

*krátké zkumavky, zátky, dávkovače, pumpičkové dávkovače, Pasteurova pipeta, vortex, stopky, kruhový stojan na zkumavky, hrnec, kahan a trojnožka nebo vařič, termostat, fotometr, ledová lázeň*

**V úloze pracujete s toxickými činidly (zejména Somogyiho-Nelsonovo činidlo III) – pracujte se zvýšenou opatrností!**

Postup:

*Příprava sady pufrů s různým pH:* Do odměrného válce nalijte hydrogenfosforečnan sodný (0,2 mol/l) podle rozpisu a doplňte kyselinou citronovou (0,1 mol/l) na celkový objem 25 ml. Připravený pufr přelijte do označené titrační baňky.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| baňka  č. | 0,2mol/l hydrogenfosforečnan disodný  (ml) | přibližná teoretická hodnota pH pufru | hodnota pH pufru stanovená pH-metrem |
| 1 | 5,0 | 3,0 |  |
| 2 | 8,8 | 4,0 |  |
| 3 | 12,5 | 4,8 |  |
| 4 | 14,0 | 5,4 |  |
| 5 | 15,0 | 5,8 |  |
| 6 | 18,1 | 6,6 |  |
| 7 | 20,6 | 7,0 |  |
| 8 | 23,4 | 7,6 |  |
| 9 | 24,3 | 8,0 |  |
| 10 | 25,0 | 8,5 |  |

pH připravených pufrů zjistěte pH-metrem.

***Příprava enzymového preparátu α-amylasy:*** Do 10ml odměrné baňky odpipetujte 1 ml vlastních slin, obsah doplňte po značku fyziologickým roztokem s přídavkem chloridu vápenatého.

***Stanovení aktivity α-amylasy:***Do 10 krátkých zkumavek (sada A) pipetujte dávkovačem 0,5 ml roztoku škrobu, do každé z nich přidejte 2,4 ml pufru s různým pH – zkumavky označte čísly 1–10 a hodnotou pH pufru. Do dalších 10 zkumavek (sada B) označených stejně jako zkumavky sady A dejte 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla I. (Somogyiho-Nelsonovo činidlo I v této sadě zkumavek slouží jednak k ukončení enzymové reakce, jednak ke stanovení vzniklých produktů.)

Termostat vytemperujte na teplotu 30 °C. Po ustálení teploty do něj vložte zkumavky sady A a ponechejte temperovat 10 minut. Po uplynutí této doby vložte zkumavky sady B do vroucí vodní lázně.

Ve zkumavkách sady A temperovaných na teplotu 30 °C startujte enzymovou reakci přídavkem 0,1 ml zředěných slin v intervalu 30 s (spusťte stopky, po 30 sekundách startujte přídavkem zředěných slin v první zkumavce, reakční směs promíchejte, stopky nevypínejte, po dalších 30 sekundách startujte přídavkem zředěných slin ve druhé zkumavce, reakční směs promíchejte, stopky nevypínejte, viz tabulka). Přesně po 15 minutách opět v pravidelných intervalech 30 sekund odeberte z každé zkumavky dávkovačem 0,5 ml reakční směsi a pipetujte do příslušné zkumavky sady B se Somogyiho-Nelsonovým činidlem I na vroucí vodní lázni (viz tabulka). Dbejte, aby špička pipety zasahovala pod hladinu činidla, nenechávejte vzorek stékat po stěně zkumavky.

Během enzymové reakce zůstávají zkumavky s reakční směsí v termostatu.

Po odebrání všech vzorků reakčních směsí uložte jejich zbytky (nepoužité pro stanovení koncentrace maltosy) do ledové lázně (nevyhazujte je).

Připravte slepý vzorek pro fotometrii – v označené zkumavce smíchejte 0,5 ml vody a 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla I. Zkumavku vložte do vroucí vodní lázně.

Všechny zkumavky ponechejte ve vroucí vodní lázni asi 3 minuty a pak je nechejte chladnout při laboratorní teplotě.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| zkumavka  (pH) | *start reakce*  *(přídavek zředěných slin)*  *- čas na stopkách* | *konec reakce*  *(vnesení vzorku do Somogyiho-Nelsonova činidla I)*  *- čas na stopkách* |
| 3,0 | 30´´ | 15´30´ |
| 4,0 | 1´ | 16´ |
| 4,8 | 1´30´´ | 16´30´´ |
| 5,4 | 2´ | 17´ |
| 5,8 | 2´30´´ | 17´30´´ |
| 6,6 | 3´ | 18´ |
| 7,0 | 3´30´´ | 18´30´´ |
| 7,6 | 4´ | 19´ |
| 8,0 | 4´30´´ | 19´30´´ |
| 8,5 | 5´ | 20´ |

***Stanovení koncentrace maltosy v reakčních směsích:*** Do každé zkumavky sady B (obsahující nyní reakční směs nebo vodu a Somogyiho-Nelsonovo činidlo I) přidejte 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla II, jejich obsah promíchejte a ponechejte je na vroucí vodní lázni dalších 10 minut. Pak zkumavky ochlaďte vodou, přidejte do nich 2 ml Somogyiho-Nelsonova činidla III, promíchejte, ponechejte stát po dobu nejméně 2 minut při laboratorní teplotě a opět promíchejte (vypuzení oxidu uhličitého ze vzorku).

Změřte absorbanci vzorků, v nichž probíhala enzymová reakce, proti slepému vzorku při vlnové délce 740 nm. Překračují-li absorbance některých vzorků hodnotu 0,8, **všechny** vzorky definovaným způsobem nařeďte vodou (zvolte vhodné násobné ředění) a znovu změřte proti stejným způsobem zředěnému slepému vzorku.

Do zbytků reakčních směsí a přidejte pomocí Pasteurovy pipety kapku Lugolova roztoku, promíchejte. Pozorujte zbarvení vzorků a jeho intenzitu v závislosti na pH reakční směsi. Pokud nemáte k dispozici kontrolní vzorek obsahující nerozštěpený škrob z části úlohy A, připravte si jej smícháním 0,5 ml roztoku škrobu a 1,5 ml vody.

**Vyhodnocení:**

Uveďte následující údaje a tabulku doplněnou experimentálními a vypočtenými údaji:

- doba reakce (min):

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| zkumavka č. | *A*740 | *c* maltosy ve vzorku pro fotometrii\*  [mmol·l−1] | ředění vzorku pro fotometrii | *c* maltosy v reakční směsi\*\*  [mmol·l−1] |
| 1 |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |
| 3 |  |  |  |  |
| 4 |  |  |  |  |
| 5 |  |  |  |  |
| 6 |  |  |  |  |
| 7 |  |  |  |  |
| 8 |  |  |  |  |
| 9 |  |  |  |  |
| 10 |  |  |  |  |

*\*) při výpočtu koncentrace maltosy použijte kalibrační graf*

*\*\*) koncentrace redukujících sacharidů vynásobená ředěním pro fotometrii*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| zkumavka  č. | pH  (zjištěné pH-metrem) | *c* maltosy  v reakční směsi  [μmol·l−1] | *v* vzniku  maltosy  [μmol·l−1·min−1] | zbarvení reakčních směsí po přidání Lugolova roztoku |
| 1 |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |
| 3 |  |  |  |  |
| 4 |  |  |  |  |
| 5 |  |  |  |  |
| 6 |  |  |  |  |
| 7 |  |  |  |  |
| 8 |  |  |  |  |
| 9 |  |  |  |  |
| 10 |  |  |  |  |
| *pH optimum* | | | *v* vzniku  maltosy  [μmol·l−1·min−1] |
|  |

Do grafu vyneste závislost rychlosti vzniku maltosy na pH prostředí. Uveďte, při kterém pH probíhala α-amylasová reakce nejrychleji:

**KONTROLNÍ LIST**

|  |  |
| --- | --- |
| **jména:** | |
| **obor:** | **datum provedení:** |

**ÚLOHA 7A** – kalibrační graf

|  |  |
| --- | --- |
| zkumavka  č. | *A*740 |
|
| 1 | 0,000 |
| 2 |  |
| 3 |  |
| 4 |  |
| 5 |  |
| 6 |  |

Podpis vedoucího cvičení:

**ÚLOHA 7A** – stanovení aktivity α-amylasy

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| zkumavka č. | ředění  vzorku pro  fotometrii | *A*740  zředěného vzorku | zbarvení reakčních směsí po přidání Lugolova roztoku |
| 1 |  |  |  |
| 2 |  |  |  |
| 3 |  |  |  |
| 4 |  |  |  |
| 5 |  |  |  |

zbarvení kontrolního vzorku po přidání Lugolova roztoku:

Podpis vedoucího cvičení:

**ÚLOHA 7B**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| pH  (zjištěné  pH metrem) | ředění vzorku pro fotometrii | *A*740  zředěného vzorku | zbarvení reakčních směsí po přidání Lugolova roztoku |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

Podpis vedoucího cvičení: