

jména:	
obor:	datum provedení:

přílohy protokolu:

graf: časová závislost konverze sacharosy v enzymovém reaktoru
graf: kalibrační přímka pro stanovení redukujících sacharidů Somogyiho metodou

OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

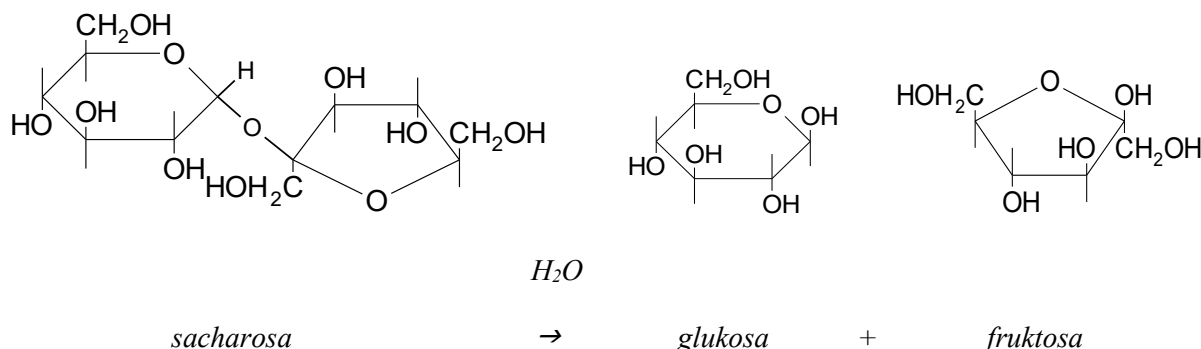
Redukující a neredukující sacharidy. Sacharasová reakce, princip měření sacharasové aktivity. Rychlost enzymové reakce, aktivita enzymu. Specifická aktivita enzymu. Chemické výpočty.

PRINCIP ÚLOHY

A. Příprava enzymového minireaktoru (imobilizace sacharosy v alginátovém gelu).

Výhodou imobilizace enzymu je možnost jeho opakovaného použití. V enzymových reaktorech bývá enzym zpravidla uzavřen v částicích gelu nebo mikrokapsulích. Při průtoku substrátu reaktorem dochází k jeho přeměně na produkt. V enzymových reaktorech lze snadno udržovat optimální podmínky enzymové reakce.

Sacharasa (invertasa, systematický název: β -D-fruktofuranosid-fruktohydrolasa) hydrolyzuje disacharid sacharosu za vzniku monosacharidů glukosu a fruktosu:



Kvasničná sacharasa je glykoprotein s molekulovou hmotností cca 270 kDa, který je lokalizován na vnější straně buňky, odkud může být poměrně snadno uvolněn (jiná forma enzymu přítomná jen v malém množství se nachází uvnitř buňky.) Štěpení sacharosy kvasničnou sacharasou na směs glukosu a fruktosu (tzv. invertní cukr) má průmyslový význam (invertní cukr má vyšší sladkost než sacharosa). Pekařské kvasnice produkují velká množství sacharosy a zanedbatelná množství ostatních glykosidas.

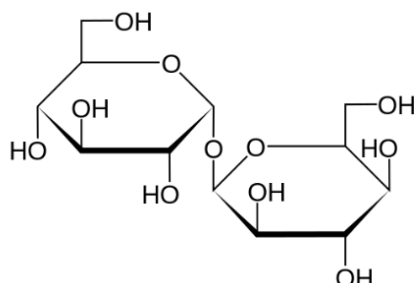
Sacharosa (α -D-glukopyranosyl-(1-2)- β -D-fruktofuranosa) je neredukující disacharid trehalosového typu, vzniklý spojením glukosové a fruktosové podjednotky prostřednictvím jejich poloacetalových hydroxylových skupin. Množství glukosu a fruktosu vzniklých sacharasovou reakcí lze stanovit metodou podle Somogyiho.

Pro demonstraci substrátové specifity sacharosy se mohou jako alternativní substráty testovat i následující sacharidy: disacharid **trehalosa** a trisacharid **rafinosa**.

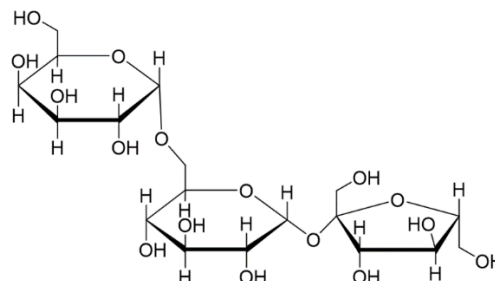
Trehalosa (α -D-glukopyranosyl-(1-1)- α -D-glukopyranosa) je neredukující disacharid vzniklý spojením glukosových podjednotek prostřednictvím jejich poloacetalových hydroxylových skupin. Hydrolyzou

trehalosa vzniká glukosa, jejíž množství lze na základě jejích redukujících vlastností stanovit metodou podle Somogyiho.

Rafinosa (α -D-galaktopyranosyl-(1-6)- α -D-glukopyranosyl- β (1-2)-D-fruktofuranosa) je neredukující trisacharid, vznikl spojením galaktosové, glukosové a fruktosové podjednotky prostřednictvím jejich poloacetalových hydroxylových skupin. Hydrolýzou mohou vznikat redukující produkty, jejichž množství lze stanovit na základě jejich redukujících vlastností metodou podle Somogyiho.



trehalosa



rafinosa

Důležité pojmy v oblasti enzymových reakcí:

Rychlost enzymové reakce lze definovat jako změnu koncentrace substrátu c (mol/l) za čas t (s) podle vzorce: v [$\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{l}^{-1}$] = dc/dt .

Enzymová aktivita ($\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$) je definována jako limitní rychlost enzymové reakce za definovaných podmínek, mezi něž patří 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 (množství v daném systému) enzymu, která přemění 1 mol látky za sekundu ($\text{kat} = \text{mol/s}$). 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 mezinárodní jednotka (IU), která je definována jako $\mu\text{mol}/\text{min}$.

Specifická aktivita enzymu je aktivita vztažená např. k hmotnosti celkového proteinu (např. nkat/mg) či k objemu (např. nkat/ml) nebo hmotnosti (např. nkat/mg) biologického vzorku.

B. Stanovení koncentrace redukujících sacharidů Somogyiho metodou.

Sacharidy obsahující volnou hemiacetalovou hydroxylovou skupinu **redukují** v alkalickém prostředí za zvýšené teploty ($100\text{ }^\circ\text{C}$) **komplexní měďnatou sůl** (vytvořenou při smíchání Somogyi-Nelsonova činidla I a II) za vzniku **měďných iontů**, které dále **redukují arsenomolybdenan** (součást Somogyi-Nelsonova činidla III) **na molybdenovou modř**. Ta je barevným reakčním produktem s absorpčním maximem při vlnové délce **740 nm**, jehož koncentraci lze stanovit fotometricky. **Intenzita modrého zbarvení je tedy přímo úměrná koncentraci redukujících sacharidů**. Při nízkých koncentracích redukujících sacharidů ve vzorku je výsledné zbarvení modrozelené nebo trávově zelené. Metoda je **velmi citlivá**: je vhodná pro vzorky obsahující velmi malá látková množství redukujících sacharidů (řádově $0,1\ \mu\text{mol}$). Na druhé straně však jakékoliv **nečistoty** redukujících látek ve zkumavkách a pipetách falešně pozitivně ovlivňují získané výsledky.

PRAKTICKÁ ČÁST A. Příprava enzymového minireaktoru (imobilizace sacharasy v alginátovém gelu).

Materiál a vybavení:

pekařské kvasnice

0,1 mol.l⁻¹ fosfátový pufr pH 8,0

1,5 % alginát sodný

0,1 mol.l⁻¹ chlorid vápenatý

0,1 mol.l⁻¹ sacharosa v 0,1 mol.l⁻¹ octanovém pufru pH 5 (čerstvě připravený roztok)

Somogyiho-Nelsonovo činidlo I (roztok uhličitanu sodného, vlnanu 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)

Erlenmeyerova baňka a tyčinka nebo homogenizátor, odměrný válec, předvážky, elektromagnetická míchačka, míchadélko, centrifuga, centrifugační kyvety, injekční stříkačka s jehlou, kádinky, lžička, chromatografická kolona, odměrné zkumavky, pipety, dávkovače, pumpičkové dávkovače, zkumavky, vortex, stopky, kruhový stojan na zkumavky, hrnec, vaříč, fotometr

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

Postup:

Příprava enzymového minireaktoru:

Suspenzi kvasnic (asi 10 g kvasnic ve 30 ml fosfátového pufru), která byla míchána 4–12 hodin, centrifugujte 10 minut při 5000 ot/min. Odeberte 4 ml supernatantu a přidejte k němu 20 ml roztoku alginátu sodného. Touto směsí naplňte injekční stříkačku a směs pomalu (po jednotlivých kapkách) vytlačujte do 50–100 ml míchaného roztoku chloridu vápenatého. Vzniklé kuličky alginátového gelu **dekantujte***. Tříkrát promyjte dekantací ve vodě. Po promytí naplňte alginátovými kuličkami připravenou kolonu: **stačí kuličkami kolonu pouze navrstvit (kuličky se nemusí použít všechny) – žádným způsobem kuličky nezatlačujte do kolony!** Ověřte funkčnost kolony – naplňte ji vodou a zjistěte, zda po otevření kohoutu voda z kolony volně vytéká. Naplněnou kolonu promyjte trojnásobným objemem vody.

* metoda oddělování kapaliny od pevné látky opatrným slitím kapaliny, zatímco pevná látka zůstane usazená na dně nádoby

Použití imobilizované sacharasy pro přípravu invertního cukru:

Z kolony nechtejте vytéci všechnu vodu, uzavřete kohout, na kolonu naneste 4 ml 0,1 mol.l⁻¹ roztoku sacharasy v octanovém pufru, ihned spusťte stopky. V časových intervalech 1 min., 2 min., 5 min., 10 min., 15 min. a 20 min. jímejte do označených odměrných zkumavek frakce o objemu přibližně 0,5 ml (po uplynutí určitého časového intervalu otevřete kohout kolony, jímejte frakci a kohout opět uzavřete). Postupně takto odeberete ze vzorku naneseného na kolonu **6 frakcí**.

Poznámka: Pokud nemáte k dispozici zkumavky s ryskou pro odečet objemu 0,5 ml, můžete do zkumavky pipetovat 0,5 ml destilované vody, zaznačit hladinu lihovým fixem a tuto zkumavku použít pro sbírání frakcí.

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

Analýza frakcí odebraných z enzymového minireaktoru:

Do čistých zkumavek (označených časovým intervalem) pipetujte vždy 0,1 ml odebrané frakce, 0,4 ml vody a pumpičkovým dávkovačem přidejte 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I. Připravte **slepý vzorek** – do (označené) zkumavky pipetujte 0,5 ml vody a přidejte 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I. Obsah **všech** zkumavek povařte cca 3 minuty. Potom do každé zkumavky přidejte pumpičkovým dávkovačem 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla II, promíchejte a ponechejte na vroucí vodní lázni 10 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu (lze chladit pomocí studené vody) přidejte pumpičkovým dávkovačem do všech vzorků

2 ml Somogyiho-Nelsonova činidla III, vzorky promíchejte a ponechte stát po dobu nejméně 2 minut při laboratorní teplotě, poté opět promíchejte (vypuzení oxidu uhličitého ze vzorku). Při měření absorbance je potřeba sledovat, zda se v kyvetách netvoří bublinky CO₂, které zkreslují měření. V případě výskytu bublinek (CO₂) v kyvetách zaťukajte kyvetou jemně o stůl, čímž CO₂ vypudíte.

Změřte absorbanci všech vzorků proti slepému vzorku při vlnové délce 740 nm. Překračují-li absorbance hodnotu 0,8, vzorky definovaným způsobem nařed'te vodou (včetně slepého vzorku). **Zapište ředění** vzorku.

Vyhodnocení:

Do protokolu uveďte tabulku doplněnou experimentálními (A_{740}) a vypočtenými údaji:

frakce odebraná v časovém intervalu	A_{740}	c(redukujících sacharidů) ve vzorku pro fotometrii* [mmol.l ⁻¹]	ředění vzorku pro fotometrii	c(redukujících sacharidů) v analyzovaném vzorku** [mmol.l ⁻¹]	c(redukujících sacharidů) v odebrané frakci*** [mmol.l ⁻¹]	konverze sacharosy [%]****
1 min.						
2 min.						
5 min.						
10 min.						
15 min.						
20 min.						

* při výpočtu koncentrace redukujících monosacharidů použijte **směrnici kalibrační přímky z části B**

** koncentrace redukujících sacharidů vynásobená ředěním pro fotometrii

*** mějte na paměti, že analyzovaný vzorek obsahoval 0,1 ml odebrané frakce a 0,4 ml vody

**** při výpočtu % konverze sacharosy vezměte v úvahu stechiometrii sacharosové reakce a koncentraci původního roztoku sacharosy naneseného na kolonu

Do grafu vynesete závislost % konverze sacharosy na době odběru vzorku z enzymového minireaktoru.

PRAKTICKÁ ČÁST B.

Stanovení koncentrace redukujících sacharidů Somogyiho metodou.

Materiál a vybavení:

standardní roztok glukosy ($0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$)

Somogyiho-Nelsonovo činidlo I (roztok uhličitanu sodného, vlnanu 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)

zkumavky, pipety, dávkovače, pumpičkové dávkovače, vaříč, hrnec, kruhový stojan na zkumavky, vortex, fotometr, kyvety

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

Postup:

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 glukosy k sestrojení kalibrační přímky (zkumavky 1-6). Zkumavka č. 1 glukosu neobsahuje, proto se použije jako slepý vzorek.

zkumavka č.	pipetovaný objem		vypočtená c (glc) [mmol.l ⁻¹]	A ₇₄₀
	0,2 mmol.l ⁻¹ roztok glc [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		

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

Do všech zkumavek přidejte pumpičkovým dávkovačem 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla I, vzorky promíchejte a zahřívějte asi 5 minut na vroucí vodní lázni. Potom přidejte do všech vzorků pumpičkovým dávkovačem 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla II a zahřívějte na vroucí vodní lázni dalších 10 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu (lze chladit pomocí studené vody) přidejte pumpičkovým dávkovačem do všech vzorků 2 ml Somogyiho-Nelsonova činidla III, vzorky promíchejte a ponechte stát po dobu nejméně 5 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 zatřesejte kyvetou jemně o stůl, čímž CO₂ vypudíte. Pokud některá z hodnot absorbance překročila hodnotu 0,8 (nad touto hranicí již není závislost absorbance na koncentraci lineární – neplatí Lambert-Beerův zákon), je nutné udělat novou kalibrační přímku, případně tuto hodnotu z kalibrace vynechat.

Vyhodnocení:

Vypočítejte koncentrace glukosy ve zkumavkách č. 2-6, výsledky doplňte do tabulky. Sestrojte kalibrační graf (závislost A₇₄₀ na koncentraci glukosy ve zkumavce). Z rovnice kalibrační přímky poté odečtete směrnici, pomocí které vypočítáte **koncentrace redukujících sacharidů v části A.**

KONTROLNÍ LIST

jména:	
obor:	datum provedení:

ÚLOHA 7A

frakce odebraná v časovém intervalu	ředění vzorku pro fotometrii	A_{740} zředěného vzorku
1 min.		
2 min.		
5 min.		
10 min.		
15 min.		
20 min.		

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 7B

zkumavka č.	A_{740}
1	0,000
2	
3	
4	
5	
6	

Podpis vedoucího cvičení: