

ĆWICZENIE V

IZOLACJA INWERTAZY. BADANIE AKTYWNOŚCI INWERTAZY

ZAKRES OBOWIĄZUJĄCEGO MATERIAŁU:

Enzymy, klasyfikacja enzymów, mechanizm katalizy enzymatycznej, budowa i właściwości fizykochemiczne węglowodanów, charakterystyka poszczególnych grup: monosacharydy, disacharydy i polisacharydy, aktywność biologiczna sacharydów, wiązanie glikozydowe.

Sprzęt:

Waga
Wirówka
Probówki wirówkowe
Mieszadło magnetyczne
Elementy mieszające
Naczynka wagowe
Zlewki 200 ml
Tryskawki
Bagietki
Termometr
Płyta grzejna
Płytki termiczna
Łopatki metalowe
Pipety
Pipety Pasteura
Kolbki miarowe 10 ml

Odczynniki:

Drożdże suszone
Piasek
Aceton
Bufor pH=4,4
Odczynnik Benedicta
Sacharoza
Na₂CO₃
Papierek wskaźnikowy
Woda destylowana

Izolacja enzymu

Do zlewki o pojemności 50 cm³ wlać 10 cm³ wody destylowanej i podgrzać na płycie grzejnej z płytką termiczną do temperatury 28°C. Następnie dodać 1,25 g suchych drożdży, 1 g piasku i całość wymieszać bagietką. Tak przygotowaną mieszaninę umieścić na mieszadle magnetycznym, dodać 5 cm³ wody destylowanej i mieszać przez 10 minut. Zawartość zlewki przenieść do probówek wirówkowych i odwirowywać przez 15 minut. Zlać roztwór z nad osadu do zlewki i do roztworu dodać trzykrotny nadmiar acetonu, wymieszać i pozostawić na 30 minut, mieszając bagietką co pewien czas. Ponownie odwirowywać przez 15 minut. Otrzymany osad (enzym) przenieść z probówek wirówkowych do cylindra miarowego, rozpuszczając go w małej ilości wody destylowanej (całkowita objętość 5 cm³).

Próba aktywności wyizolowanego enzymu.

Przygotowanie roztworów porównawczych (bez enzymu).

Przygotować po 2 cm³ roztworu monosacharydu (glukozy) o stężeniach odpowiednio 3%, 2%, 1.5%, 1%, 0.5%. Następnie przygotować 6 probówek. W 5 umieścić 1 cm³ roztworu monosacharydu o odpowiednim stężeniu i 1 cm³ buforu. W 6-tej probówce umieścić tylko 1 cm³ buforu. Roztwory wymieszać i ogrzewać na łaźni wodnej przez 10 minut w temperaturze 30°C. W tym czasie przygotować w czajniku bezprzewodowym wrzątek, tak aby w 11-tej minucie wymienić wodę o temperaturze 30°C na wrzątek (nie wyłączać płyty elektrycznej pod łaźnią wodną!). Druga osoba z pary w 11-tej minucie wyjmuje probówki z łaźni wodnej i dodaje do każdej stałego Na₂CO₃ w celu otrzymania roztworu o pH 6-7, a następnie do tak przygotowanych roztworów dodaje po 2 cm³ odczynnika Benedicta. *Odczynnik Benedicta jest wskaźnikiem zawierającym jony Cu²⁺ i służy do określenia zawartości monosacharydu w roztworze. Barwa roztworu zależy od stężenia monosacharydu.*

UWAGA Po dodaniu wskaźnika roztwory wymieszać i natychmiast włożyć do wrzącej łaźni wodnej, ogrzewać przez 2 minuty, a następnie ochłodzić roztwór w zimnej wodzie. Zanotować otrzymane kolory roztworów.

Barwa roztworu porównawczego	% monosacharydu w roztworze
	3
	2
	1,5
	1
	0,5
	0

Próba aktywności enzymu

1. Próba aktywności enzymu z dodatkiem ZnCl₂.

Przygotować 2cm³ roztworu sacharozy o stężeniu 5%. W probówce umieścić 1 cm³ enzymu rozpuszczonego w wodzie, 1 cm³ 5% roztworu sacharozy i 1 cm³ buforu. Roztwór wymieszać i ogrzewać na łaźni wodnej przez 2-3 minuty w temperaturze 30°C. Następnie do roztworu dodać

1 cm³ 0,5% roztworu ZnCl₂, wymieszać i pozostawić w łaźni wodnej przez około 10 minut. W tym czasie przygotować w czajniku bezprzewodowym wrzątek, tak aby w 11-tej minucie wymienić wodę o temperaturze 30°C na wrzątek (nie wyłączać płyty grzejnej pod łaźnią wodną!). Druga osoba z pary w 11-tej minucie wyjmuję probówkę z łaźni wodnej i dodaje stałego Na₂CO₃ w celu otrzymania roztworu o pH 6-7, a następnie do tak przygotowanego roztworu dodać 1 cm³ odczynnika Benedicta, wymieszać i natychmiast włożyć do wrzącej łaźni wodnej, ogrzewać przez 3-5 minut, a następnie ochłodzić roztwór w zimnej wodzie.

Obserwować zmianę zabarwienia roztworu w probówce i porównać z uprzednio przygotowanymi roztworami porównawczymi.

2. Próba aktywności enzymu bez dodatku ZnCl₂.

Przygotować 2cm³ roztworu sacharozy o stężeniu 5%. W probówce umieścić 1 cm³ enzymu rozpuszczonego w wodzie, 1 cm³ 5% roztworu sacharozy i 1 cm³ buforu (odczynnik roztworu powinien być lekko kwaśny). Roztwór wymieszać i ogrzewać na łaźni wodnej przez 10 minut w temperaturze 30°C. W tym czasie przygotować w czajniku bezprzewodowym wrzątek, tak aby w 11-tej minucie wymienić wodę o temperaturze 30°C na wrzątek (nie wyłączać płyty grzejnej pod łaźnią wodną!). Druga osoba z pary w 11-tej minucie wyjmuję probówkę z łaźni wodnej i dodaje stałego Na₂CO₃ w celu otrzymania roztworu o pH 6-7, a następnie do tak przygotowanego roztworu dodać 2 cm³ odczynnika Benedicta, wymieszać i natychmiast włożyć do wrzącej łaźni wodnej, ogrzewać przez 3-5 minut, a następnie ochłodzić roztwór pod zimną wodą.

Obserwować zmianę zabarwienia w probówce i porównać z uprzednio przygotowanymi roztworami porównawczymi.

Opracowanie wyników:

- zapisać wszystkie potrzebne obliczenia
- zapisać równania przeprowadzonych reakcji
- narysować wzory strukturalne substratów i produktów reakcji
- zapisać otrzymane kolory roztworów
- określić jaki wpływ na przebieg reakcji miał dodatek chlorku cynku
- zapropozować mechanizm działania inwertazy

LITERATURA:

1. „Wykłady z chemii bionieorganicznej”
2. S.J. Lippard, J.M. Berg „Podstawy chemii bionieorganicznej”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998
3. W. Zieliński, A. Rajcy, „Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych”, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2000
4. J.M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, „Biochemia”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005. J.D. Lee, „Zwięzła chemia nieorganiczna”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999
5. F.A. Cotton, G. Wilkinson, P.L. Gaus, „Chemia nieorganiczna”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1990
6. R.M. Roat-Malone, „Chemia bionieorganiczna”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2010