

jména:	
obor:	datum provedení:

přílohy protokolu: graf: časová závislost konverze sacharosu 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.

Obory molekulární biologie, chemie, biochemie (pětihodinová a sedmihodinová cvičení): části A, B, C.

Biologické obory kromě molekulární biologie (tříhodinová cvičení): části A, D.

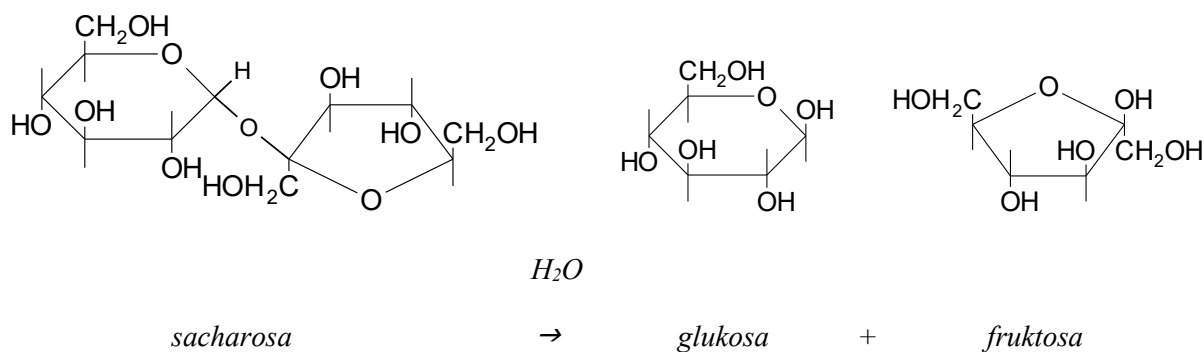
Učiteléské kombinace (čtyřhodinová cvičení): části A, D.

PRINCIP ÚLOHY

A. Příprava enzymového minireaktoru (imobilizace sacharasy 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 sacharosu 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 sacharasy a zanedbatelná množství ostatních glykosidas.

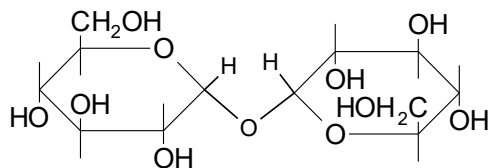
Sacharosa (α -D-glukopyranosyl-(1-2)- β -D-fruktofuranosa) je neredukující disacharid trehalosového typu, vzniklý spojením glukosové a fruktosové podjednotky prostřednictvím jejich polo acetalových hydroxylových skupin. Množství glukosu a fruktosu vzniklých sacharasovou reakcí lze stanovit metodou podle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

B. Substrátová specifita sacharasy

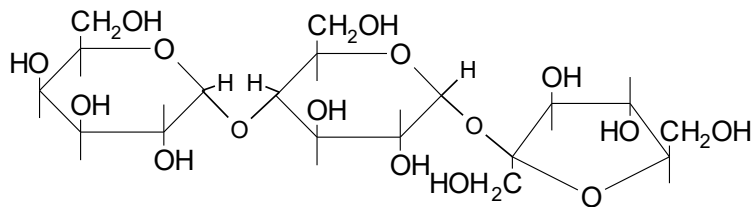
Jako alternativní substráty sacharasy budou v úloze dále použity disacharid trehalosa a trisacharid rafinosa.

Trehalosa (α -D-glukopyranosyl-(1-1)- α -D-glukopyranosa) je neredukující disacharid vzniklý spojením glukosových podjednotek prostřednictvím jejich polo acetalových hydroxylových skupin. Hydrolýzou trehalosy vzniká glukosa, jejíž množství lze na základě jejich redukujících vlastností stanovit metodou podle Somogyiho.

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



trehalosa



rafinosa

Substrátová specifita kvasničné sacharasy bude v této úloze stanovena orientačně pomocí měření rychlosti vzniku redukujících sacharidů během sacharosové reakce při laboratorní teplotě.

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 .

C. Stanovení aktivity sacharasy v kvasnicích

V této části úlohy bude stanovena aktivita sacharasy a specifická aktivita sacharasy za optimálních podmínek (teplota, pH, nasycení enzymu substrátem) v kvasnicích.

Enzymová aktivita ($\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$) 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 ($\text{kat} = \text{mol/s}$). 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 $\mu\text{mol/min}$.

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

D. Stanovení koncentrace redukujících sacharidů Somogyiho metodou

Sacharidy obsahující volnou hemiacetalovou hydroxylovou skupinu redukují v alkalickém prostředí za zvýšené teploty (100 °C) komplexní měďnatou sůl za vzniku měďných iontů, které dále redukují arsenomolybdenan na molybdenovou modř – barevný reakční produkt s absorpčním maximem při vlnové délce 740 nm, jehož koncentraci lze stanovit fotometricky (zbarvení je stálé po dobu několika hodin. Metoda je vhodná pro vzorky obsahující velmi malá množství redukujících sacharidů (řádově 0,1 μmol).

PRAKTICKÁ ČÁST A. Imobilizace sacharasy v alginátovém gelu, příprava enzymového minireaktoru

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, kahan a trojnožka nebo vaříč, fotometr

V úloze pracujete s toxickými činidly (zejména Somogyiho-Nelsonovo činidlo III) - 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. Třikrát promyjte dekantací ve vodě. Po promytí naplňte alginátovými kuličkami připravenou kolonu. Ověřte funkčnost kolony – naplňte ji vodou a zjistěte, zda po otevření kohoutu voda z kolony volně vytéká. Naplněnou kolonu promyjte trojnásobným objemem vody.

Použití imobilizované sacharasy pro přípravu invertního cukru: Z kolony nechejte 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).

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 a nechejte zchladnout na laboratorní teplotu. Potom do každé zkumavky přidejte pumpičkovým dávkovačem 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla II, promíchejte a ponechte 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 (a 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 zaťukejte 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 nařeďte 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 kalibrační graf z úlohy č. 1 (resp. z části D)

**) koncentrace redukujících sacharidů vynásobená ředěním pro fotometrii

***) analyzovaný vzorek obsahoval 0,1 ml odebrané frakce a 0,4 ml vody

****) při výpočtu % konverze sacharosy vezměte v úvahu stechiometrii sacharasové 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. Substrátová specifita sacharasy

Materiál a vybavení:

extrakt z kvasnic (připravený v úloze 6a)

0,1 mol.l⁻¹ octanový pufr pH 5

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

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

0,1 mol.l⁻¹ rafinosa 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)

zkumavky, pipety, dávkovače, pumpičkové dávkovače, stopky, kruhový stojan na zkumavky, hrnec, kahan a trojnožka nebo vaříč, fotometr, vortex

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

Postup:

Do 7 krátkých zkumavek (sada A) pipetujte podle rozpisu:

zkumavka č.	1,0 ml
1	0,1 mol.l ⁻¹ octanový pufr pH 5
2	0,1 mol.l ⁻¹ roztok sacharosy*
3	0,1 mol.l ⁻¹ roztok sacharosy*
4	0,1 mol.l ⁻¹ roztok trehalosy*
5	0,1 mol.l ⁻¹ roztok trehalosy*
6	0,1 mol.l ⁻¹ roztok rafinosy*
7	0,1 mol.l ⁻¹ roztok rafinosy*

*roztoky sacharidů v 0,1 mol.l⁻¹ octanovém pufru

Do dalších 7 zkumavek (sada B) přidejte pumpičkovým dávkovačem 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 vyteperujte na teplotu 30 °C. Po ustálení teploty do něj vložte zkumavky sady A a ponechtejte temperovat 5 - 10 minut. Po uplynutí této doby vložte zkumavky sady B do vroucí vodní lázně.

V časových intervalech 30 s přidávejte do zkumavek sady A po 50 µl kvasničného extraktu (spusťte stopky, po 30 sekundách startujte přidávkem extraktu v první zkumavce, reakční směs promíchejte, stopky nevypínejte, po dalších 30 sekundách startujte přidávkem extraktu ve druhé zkumavce, reakční směs promíchejte, stopky nevypínejte, viz tabulka). Přesně po 5 minutách opět v pravidelných intervalech 30 sekund (viz tabulka) odeberte z každé zkumavky dávkovačem 0,5 ml reakční směsi a pipetujte do zkumavky se Somogyiho-Nelsonovým činidlem I (sada B), na vroucí vodní lázni. Dbejte, aby špička pipety zasahovala pod hladinu činidla, nenechávejte vzorek stékat po stěně zkumavky.

Během enzymové reakce zůstávají zkumavky s reakční směsí v termostatu.

Všechny zkumavky sady B ponechtejte ve vroucí vodní lázni asi 5 minut a pak je nechte chladnout při laboratorní teplotě.

zkumavka č.	start reakce (přídavek extraktu) - čas na stopkách	konec reakce (vnese ní vzorku do Somogyiho- Nelsonova činidla I) - čas na stopkách
1	30''	5'30''
2	1'	6'
3	1'30''	6'30''
4	2'	7'
5	2'30''	7'30''
6	3'	8'
7	3'30''	8'30''

Potom přidejte do každé zkumavky pumpičkovým dávkovačem 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla II, promíchejte a ponechte 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 a 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 zařukejte 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 nařeďte vodou (včetně slepého vzorku zkumavka č. 1).

Vyhodnocení:

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

substrát	A_{740}	\emptyset A_{740}	c (redukujících sacharidů) ve vzorku pro fotometrii* [mmol.l ⁻¹]	ředění vzorku pro fotometrii	c (redukujících sacharidů) v reakční směsi [mmol.l ⁻¹]**	V_{vzniku} (redukujících sacharidů) [mmol.l ⁻¹ .min ⁻¹]
sacharosa						
sacharosa						
trehalosa						
trehalosa						
rafinosa						
rafinosa						

*) při výpočtu koncentrace redukujících monosacharidů použijte kalibrační graf z úlohy č. 1 (resp. z části D)

**) koncentrace redukujících sacharidů vynásobená ředěním pro fotometrii

Určete substrátovou specifitu sacharasy (srovnejte aktivitu sacharasy v přítomnosti jednotlivých sacharidů) a zjištěné výsledky vysvětlete:

Teoretický úkol:

Hydrolýza rafinosy může teoreticky proběhnout třemi způsoby (napište schémata štěpení rafinosy pomocí zkratk názvů sacharidů):

1)

2)

3)

Který způsob štěpení rafinosy pokládáte za nejpravděpodobnější a proč?

PRAKTICKÁ ČÁST C. Stanovení aktivity sacharasy

Materiál a vybavení:

pekařské kvasnice

0,8 mol.l⁻¹ sacharosa, čerstvě připravený roztok

0,6 mol.l⁻¹ octanový pufr pH 5

0,1 mol.l⁻¹ octanový pufr pH 5

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)

předvážky, Erlenmeyerova baňka a tyčinka nebo homogenizátor, odměrný válec, odměrná baňka 50 ml, ledová lázeň, zkumavky, pipety, dávkovače, pumpičkové dávkovače, stopky, termostat, krátké zkumavky, vortex, kruhový stojan na zkumavky, hrnec, kahan a trojnožka nebo vaříč, fotometr

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

Postup:

Příprava enzymového preparátu sacharasy: Navažte 0,2 g pekařských kvasnic a důkladně rozmíchejte v baňce tyčinkou ve 20 ml 0,1 mol.l⁻¹ octanového pufru. Odeberte dávkovačem 0,5 ml této suspenze a v odměrné baňce doplňte 0,1 mol.l⁻¹ octanovým pufrům objem na 50 ml. Zředěnou i nezředěnou suspenzi **označte** a uschovejte v ledové lázni.

Stanovení aktivity sacharasy: Do 6 krátkých zkumavek (sada A) pipetujte 1,5 ml 0,8 mol.l⁻¹ roztoku sacharasy a dávkovačem přidejte 0,5 ml 0,6 mol.l⁻¹ octanového pufru. Do jedné z nich přidejte 1 ml 0,1 mol.l⁻¹ octanového pufru (její obsah bude sloužit jako kontrola neenzymatického rozkladu sacharasy), tuto zkumavku označte A/K (kontrolní vzorek).

Do dalších 6 zkumavek (sada B) dejte pumpičkovým dávkovačem 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 5–10 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 přídatkem 1 ml **zředěné** suspenze kvasnic v intervalu 30 s (spusťte stopky, po 30 sekundách startujte přídatkem zředěné suspenze v první zkumavce, reakční směs promíchejte, stopky nevypínejte, po dalších 30 sekundách startujte přídatkem zředěné suspenze ve druhé zkumavce, reakční směs promíchejte, stopky nevypínejte, viz tabulka). Přesně po 5 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 ve vroucí vodní lázni přeneste dávkovačem **s čistou špičkou (pozor na kontaminaci kontrolního vzorku suspenzí kvasnic)** 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.

zkumavka č.	start reakce (přídavek suspenze kvasnic) - čas na stopkách	konec reakce (vnesení vzorku do Somogyiho- Nelsonova činidla I) - čas na stopkách
1	30''	5'30''
2	1'	6'
3	1'30''	6'30''
4	2'	7'
5	2'30''	7'30''

Stanovení koncentrace redukujících monosacharidů v reakčních směsích: Do každé zkumavky sady B (obsahující nyní reakční směs nebo kontrolní vzorek a Somogyiho-Nelsonovo činidlo I) přidejte pumpičkovým dávkovačem 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla II, jejich obsah promíchejte a ponechte je na vroucí vodní lázni dalších 10 minut. Pak zkumavky ochlaďte vodou, přidejte do nich pumpičkovým dávkovačem 2 ml Somogyiho-Nelsonova činidla III, promíchejte, ponechte stát po dobu nejméně 2 minut při laboratorní teplotě a 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 vzorků, v nichž probíhala enzymová reakce, proti kontrolnímu vzorku při vlnové délce 740 nm. 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.

Vyhodnocení:

Vypočítejte výslednou koncentraci kvasnic ve zředěné suspenzi:

$$c = \quad \text{mg.ml}^{-1}$$

Uveďte následující údaje a tabulku doplněnou experimentálními a vypočtenými údaji:

- objem reakční směsi (ml):
- doba reakce (min):
- hmotnost kvasnic obsažených v reakční směsi (mg):

zkumavka č.	A ₇₄₀	Ø A ₇₄₀	c(redukujících sacharidů) ve vzorku pro fotometrii* [mmol.l ⁻¹]	ředění vzorku pro fotometrii	c(redukujících sacharidů) v reakční směsi** [mmol.l ⁻¹]
1					
2					
3					
4					
5					

*) při výpočtu koncentrace redukujících monosacharidů použijte kalibrační graf z úlohy č. 1 (resp. z části D)

**) koncentrace redukujících sacharidů vynásobená ředěním pro fotometrii

n (redukujících sacharidů) v reakční směsi [μmol]	aktivita sacharasy [μmol.min ⁻¹]*	specifická aktivita sacharasy [μmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹]**
	[nkat]	[nkat.mg ⁻¹]

*) v celém objemu reakční směsi

***) aktivita vztahovaná na mg kvasnic

PRAKTICKÁ ČÁST D. 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, kahan a trojnožka nebo vaříč, hrnec, kruhový stojan na zkušavky, vortex, fotometr, kyvety

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

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

Postup:

Nachystejte si sadu 6 zkušavek, 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 (zkušavky 1-6). Zkušavka č. 1 glukosu neobsahuje, proto se použije jako slepý vzorek.

zkušavka 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		

Do všech zkušavek přidejte pumpičkovým dávkovačem 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla I, vzorky promíchejte a zahřívajte asi 5 minut na vroucí vodní lázni. Potom přidejte do všech vzorků pumpičkovým dávkovačem 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla II a zahřívajte 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 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 zkušavek), 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 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.

Vyhodnocení:

Vypočítejte koncentrace glukosy ve zkušavkách č. 2-6, výsledky doplňte do tabulky. Sestrojte kalibrační graf (závislost A₇₄₀ na koncentraci glukosy ve zkušavce).

KONTROLNÍ LIST

jména:	
obor:	datum provedení:

ÚLOHA 6A

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 6B

substrát	ředění vzorku pro fotometrii	A ₇₄₀ zředěného vzorku
sacharosa		
sacharosa		
trehalosa		
trehalosa		
rafinosa		
rafinosa		

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 6C

zkumavka č.	ředění vzorku pro fotometrii	A ₇₄₀ zředěného vzorku
1		
2		
3		
4		
5		

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 6D

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

Podpis vedoucího cvičení: