

## 5. ANALIZA ILOŚCIOWA I PRZEMIANY CUKROWCÓW

### ZAGADNIENIA DO OPRACOWANIA:

- Cukrzyca – podłoże, symptomy i skutki. Hormonalna regulacja gospodarki cukrowej przez insulinę i glukagon. Znaczenie oznaczania poziomu cukru we krwi.
- Przemiany cukrów w organizmie (glikoliza, fermentacja, cykl Corich, efekt Pasteura, glukoneogeneza).
- Działanie, występowanie i rola enzymów: glukozo-6-fosfatazy, inwertazy, amylazy.
- Zasady wszystkich wykonywanych na ćwiczeniach oznaczeń.

### 5.1. Oznaczanie glukozy metodą Somogyi-Nelsona

Cukrzyca jest chorobą metaboliczną wynikającą albo ze zbyt niskiej produkcji insuliny (cukrzyca typu I) albo z obniżonej wrażliwości na ten hormon (cukrzyca typu II). W obu przypadkach skutkiem choroby i jednocześnie podstawowym jej symptomem jest podwyższony poziom glukozy we krwi. Cukrzyca jest obecnie chorobą chroniczną i nieuleczalną, jednak stosując odpowiednią dietę i odpowiednie dawkowanie insuliny (w przypadku cukrzycy typu I) można kontrolować poziom cukru we krwi, a dzięki temu spowalniać rozwój choroby. W tym celu chorzy na cukrzycę muszą mierzyć poziom glukozy we krwi. Obecnie dostępne glukometry bazują na elektrochemicznej reakcji enzymatycznej. Studenci na ćwiczeniach zapoznają się z prostszą metodą kolorymetryczną oznaczania poziomu cukru we krwi.

#### ZASADA:

Glukoza w obecności winianu sodowo-potasowego redukuje jon  $\text{Cu}^{2+}$  do  $\text{Cu}^+$ . Tlenek miedziowy (I) wchodzi w reakcję z odczynnikiem zawierającym kwas arsenomolibdenowy, łatwo ulegający redukcji do błękitu molibdenowego. Natężenie barwy błękitu molibdenowego jest proporcjonalne do ilości  $\text{Cu}_2\text{O}$  a więc tym samym do ilości glukozy w próbce.

#### WYKONANIE:

Przygotowanie próbek do krzywej wzorcowej:

Przygotować 11 szklanych probówek. Do pierwszej dodać 0,5 ml wody (ślepa odczynnikowa). Do pozostałych probówek (po dwie dla każdego punktu krzywej) dodać odpowiednią objętość roztworu glukozy (o stężeniu 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) i wody zgodnie z podaną dalej tabelką:

Po dwie próbówki o numerze:	Objętość roztworu glukozy	Objętość wody
1	50 $\mu$ l	450 $\mu$ l
2	100 $\mu$ l	400 $\mu$ l
3	200 $\mu$ l	300 $\mu$ l
4	300 $\mu$ l	200 $\mu$ l
5	400 $\mu$ l	100 $\mu$ l

### PRZYGOTOWANIE PRÓBEK SUROWICY:

Przed oznaczeniem próbkę surowicy należy odbiałczyć. W tym celu przygotować dwie próbówki typu Eppendorf. Do jednej dodać 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (ślepa odczynnikowa), a do drugiej dodać 50  $\mu$ l surowicy. Do obu probówek dodać po 750  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 200  $\mu$ l 5% ZnSO<sub>4</sub> i 200  $\mu$ l 0,35 M Ba(OH)<sub>2</sub>. Zawartość obu probówek należy wymieszać, a następnie odwirować na wirówce typu Eppendorf (3 min, 14 000 obr./min). Z próbówki zawierającej ślepa odczynnikową pobrać 0,5 ml do czystej, szklanej próbówki a z próbówki zawierającej surowicę pobrać po 0,5 ml do dwóch probówek (oznaczenia, zawsze gdy to możliwe, należy przeprowadzać co najmniej w duplikatach).

Wykonanie oznaczenia: Do wszystkich 11 probówek krzywej wzorcowej i 3 próbek badanych dodać po 0,5 ml odczynnika miedziowego i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 15 min. Schłodzić próbki w strumieniu najpierw letniej a potem zimnej wody, po czym dodać po 0,5 ml odczynnika arseno-molibdenowego i po 3,5 ml H<sub>2</sub>O. Oznaczyć absorbancję dla 520 nm względem próby ślepej. Obliczyć średnie z duplikatów dla krzywej wzorcowej i próbki. Wykreślić krzywą wzorcową, pamiętając, że krzywa musi rozpoczynać się w punkcie o współrzędnych (0, 0). Jeśli absorbancja ślepej odczynnikowej „odbiałczanej” jest wyższa niż absorbancja próby ślepej przygotowanej do krzywej wzorcowej, to wartość tę należy odjąć od wartości absorbancji wyznaczonych dla próbek surowicy. Korzystając z krzywej kalibracyjnej oznaczyć ilość glukozy w próbkach badanej surowicy. Obliczyć ilość glukozy w przeliczeniu na 1 ml surowicy. Wiedząc, że stężenie glukozy w surowicy zdrowego człowieka waha się w granicach 3,6 – 6,1 mM, przedyskutować uzyskany wynik.

## 5.2. Oznaczanie aktywności glukozo-6-fosfatazy (EC 3.1.3.9)

### ZASADA:

Glukozo-6-fosfataza występuje w formie związanej z siateczką śródplazmatyczną komórek wątroby, cewek nerkowych i ścian jelit. Nie ma jej w mięśniach i tkance tłuszczowej. Najprościej można oznaczyć aktywność tego enzymu przez pomiar ilości fosforanu odszczepionego z glukozo-6-fosforanu np. metodą Fiske-Subbarowa. W środowisku kwaśnym jony fosforanowe reagują z molibdenianem (VI) amonu dając sól mieszaną molibdenianowofosforanową, która pod działaniem eikonogenu (kwas 1-amino-2-naftolo-4-sulfonowy) ulega redukcji do tlenków molibdenu (V) I (VI) dając barwny roztwór (błękit molibdenowy) o maksimum absorpcji światła przy 600 nm.

## WYKONANIE:

Zastosowano takie warunki reakcji (niewielka ilość enzymu), że reakcja przez długi czas przebiega z tą samą szybkością więc wykres zależności przyrostu produktu od czasu jest przez ponad godzinę prostoliniowy. W tym przypadku, aby wyznaczyć aktywność enzymatyczną glukozy-6-fosfatazy, nie ma potrzeby przeprowadzania kilku pomiarów przyrostu produktu w różnych odstępach czasu od zapoczątkowania reakcji, lecz wystarczy jeden pomiar (np. po 30 min). Do dwóch probówek typu Eppendorf (o objętości 2 ml) dodać po 0,1 ml nierozcieńczonego homogenatu wątroby szczura (enzym). Do jednej dodać 0,4 ml 0,1 M buforu maleinianowego pH 6,5 (próba kontrolna) a do drugiej 0,3 ml buforu maleinianowego i 0,1 ml roztworu glukozy-6-fosforanu (substrat). Probówki inkubować przez 30 min w temperaturze 37°C, a następnie do obu dodać po 1,5 ml 7% roztworu TCA w celu odbiałczenia próbek. Probówki odwirować (3 min, 14 000 obr./min) i pobrać po 1,5 ml do szklanych probówek a następnie przeprowadzić reakcję Fiske-Subbarowa poprzez dodanie po 0,2 ml 5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4 ml 2,5% molibdenianu amonu, 0,2 ml eikonogenu (przy silnym wstrząsaniu) i 2,7 ml H<sub>2</sub>O. Zmieszać i inkubować przez 10 min w temperaturze 37°C. Zmierzyć absorbancję przy 600 nm względem wody. Absorbancja błękitu molibdenowego, który powstał w wyniku reakcji 1 μmola jonów fosforanowych z molibdenianem amonu w tej objętości mieszaniny reakcyjnej wynosi 0,43.

## OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Obliczyć aktywność glukozy-6-fosfatazy w 1 ml homogenatu wątroby szczura. Od wartości uzyskanej dla próby właściwej należy odjąć wartość uzyskaną dla próby kontrolnej. Odpowiada ona ilości jonów fosforanowych obecnych w homogenacie przed dodaniem enzymu. Odjęcie tej wartości pozwoli stwierdzić ile jonów fosforanowych uwolniło się z substratu w wyniku działania enzymu. Przy obliczeniach należy uwzględnić fakt, że reakcję prowadzono w 0,5 ml mieszaniny reakcyjnej zawierającej 0,1 ml homogenatu wątroby. Przy odbiałczaniu próbki zwiększono jej objętość do 2 ml, ale ilość jonów fosforanowych oznaczano nie w całej objętości lecz w 1,5 ml.

### 5.3. Wykazanie specyficzności substratowej enzymów inwertazy (EC 3.2.1.26) oraz amylazy (EC 3.2.1.1)

#### ZASADA:

Inwertaza to fruktohydrolaza-β-D-fruktofuranozydowa. Rozkłada wiązanie beta-(1→2)-glikozydowe występujące w sacharozie. Alfa-amylaza to 1,4-α-D-glukanohydrolaza glukanowa, rozkładająca wiązania α-(1→4)-glikozydowe występujące w cząsteczce skrobi. Obydwa enzymy hydrolizują wiązania glikozydowe, ale odmiennego typu. Inwertaza nie hydrolizuje wiązań w obrębie skrobi, natomiast α-amylaza nie rozkłada sacharozy.

Skrobia i sacharoza nie mają właściwości redukujących, natomiast wykazują je produkty ich hydrolizy, co łatwo pozwala stwierdzić, czy zaszła reakcja hydrolizy tych substratów.

## WYKONANIE:

Przygotować 2 próbki zawierające po 1 ml 1% roztworu skrobi i 2 próbki zawierające po 1 ml 1% roztworu sacharozy. Do jednej próbki z roztworem skrobi i do jednej próbki z roztworem sacharozy dodać pewną ilość roztworu amylazy (wskazaną przez asystenta), a do pozostałych dwóch próbek dodać pewną ilość roztworu inwertazy (wskazaną przez asystenta). Inkubować przez godzinę w temperaturze 37°C, a następnie sprawdzić obecność cukrów redukujących we wszystkich próbkach przeprowadzając reakcję Fehlinga. Porównać wyniki. Jaki można wyciągnąć wniosek odnośnie specyficzności substratowej inwertazy i  $\alpha$ -amylazy?

## ODCZYNNIKI

Do metody Somogyi-Nelsona:

Odbiałczanie próbek: 5% wodny roztwór  $ZnSO_4$ ; 0,35 M  $Ba(OH)_2$  (5,6 g  $Ba(OH)_2$  rozpuścić w 90 ml wody, gotować przez 10 min, ostudzić, przesączyć i uzupełnić do 100 ml wodą). Odczynnik miedziowy otrzymuje się po zmieszaniu 25 ml alkalicznego roztworu winianu sodowo-potasowego (25 g  $Na_2CO_3$ , 25 g winianu sodowo-potasowego, 20 g  $NaHCO_3$  i 200 g  $Na_2SO_4$  w 1000 ml wody) z 1 ml 15%  $CuSO_4$  zakwaszonego 1 kroplą stężonego  $H_2SO_4$  (na każde 100 ml  $CuSO_4$  dodać 1–2 krople stężonego kwasu siarkowego).

Odczynnik arseno-molibdenowy otrzymuje się przez rozpuszczenie 25 g molibdenianu amonu w 450 ml  $H_2O$  i 25 ml stężonego  $H_2SO_4$  i zmieszanie z roztworem zawierającym 3 g  $Na_2HAsO_4 \cdot H_2O$  w 25 ml  $H_2O$ . Po rozpuszczaniu przez 2 dni w temperaturze 37°C, przechowywać w ciemnej butelce.

Do metody Fiske-Subbarowa:

7% TCA; 0,1 M bufor maleinianowy, pH 6,5; substrat: glukozo-6-fosforan disodowy (30 mg/1 ml buforu maleinianowego); 5 M  $H_2SO_4$ ; 2,5% molibdenian amonu (2,5 g molibdenianu amonu rozpuścić w 20 ml wody, przenieść do cylindra miarowego zawierającego 5 ml 5 M  $H_2SO_4$  i uzupełnić wodą do 100 ml); 0,25% eikonogen (kwas 1-amino-2-naftolo-4 (lub 6)-sulfonowy) (w 90 ml wody o temperaturze 90°C rozpuścić wytrząsając 15 g  $Na_2S_2O_5$ , i 0,25 g eikonogenu, dodać 1 g  $Na_2SO_3$ ; przechowywać w ciemnej butelce do kilku tygodni).

Do badania specyficzności substratowej:

1% wodny roztwór skrobi; 1% wodny roztwór sacharozy; 1% wodny roztwór  $\alpha$ -amylazy; inwertaza z drożdży — wyizolowana według następującego przepisu: 50 g drożdży i 10 g Celitu ucierać w moździerzu w 50 ml eteru, w trakcie ucierania dodawać porcjami wodę (5 × 8 ml). Po odwirowaniu (10 min, 3000 obr./min) ostrożnie zebrać nadsącz, dodać buforu octanowego pH 4,5 (na każde 10 ml nadsączu — 1,5 ml buforu) oziębic do 0°C. Dodać 3% roztwór pikrynianu (taką samą objętość jak użyta objętość buforu), pozostawić w zamrażarce przez 10 min, odwirować (5 min, 3000 obr./min). Z nadsączu wytrącić inwertazę trzykrotną objętością acetonu (-10°C), pozostawić przez 10 min w zamrażarce i odwirować (10 min, 3000 obr./min). Osad przemyć 2 razy zimnym acetonem, 1 raz eterem, próbki wysuszyć i osad rozpuścić w 10 ml wody destylowanej. Odwirować zdenaturowane i wytrącone białka, zebrać nadsącz stanowiący preparat inwertazy.

## MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:

Surowica osób zdrowych i chorych na cukrzycę, homogenat wątroby szczura (patrz otrzymywanie str. 34), wirówka na próbówki typu Eppendorf, spektrofotometr.

### 5.4. Oznaczanie aktywności inwertazy

Inwertaza to zwyczajowa nazwa  $\beta$ -fruktofuranazydy. Enzym ten, należący do grupy hydrolaz, został po raz pierwszy wyizolowany z ekstraktu drożdży przez Berthelota w 1860 roku. Hydrolizuje wiązania glikozydowe utworzone z udziałem grupy hydroksylowej w położeniu  $\beta$ , związanej z anomerycznym atomem węgla (C2) pierścienia fruktofuranozy. Jej głównym, naturalnym substratem jest sacharoza. Inwertazy występują w bakteriach i innych mikroorganizmach, w roślinach wyższych i u zwierząt. Bogatym źródłem inwertazy są drożdże. Inwertaza z drożdży wykazuje optimum działania w pH 4,0–5,5. Aktywność enzymatyczną inwertazy można oznaczyć różnymi metodami np. metodą kolorymetryczną lub metodą polarymetryczną.

#### 5.4.1. Oznaczanie aktywności inwertazy metodą polarymetryczną

##### ZASADA:

Historyczna nazwa  $\beta$ -fruktofuranazydy, inwertaza, powstała dzięki obserwacji, że dodanie tego enzymu do roztworu sacharozy prowadzi do bardzo silnych zmian w skręcalności płaszczyzny światła spolaryzowanego – roztwór wykazuje malejącą prawoskrętność, by w końcu stać się lewoskrętnym. Dzieje się tak dlatego, że spośród dwóch produktów reakcji (powstających w równomolowych ilościach) D-fruktoza jest silniej lewoskrętna niż D-glukoza prawoskrętna. Na podstawie obserwacji zmian skręcalności płaszczyzny światła spolaryzowanego zachodzących podczas hydrolizy sacharozy można wyznaczyć aktywność enzymatyczną inwertazy. Oto schemat doświadczenia:

1. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej: enzym – preparat inwertazy z drożdży, bufor – bufor octanowy o pH 4,7 (pH w zakresie optimum działania inwertazy), substrat – roztwór sacharozy.
2. Umieszczenie mieszaniny reakcyjnej w rurce polarymetru.
3. Polarymetryczne wyznaczenie kąta skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego podczas zachodzącej w rurce polarymetru reakcji hydrolizy sacharozy przez inwertazę.

##### WYKONANIE:

Do małej zlewki dodać 20 ml 10% roztworu sacharozy w 0,1 M buforze octanowym o pH 4,7, a następnie 2 ml nierozcieńczonego preparatu inwertazy i dokładnie wymieszać. Wlać mieszaninę reakcyjną do rurki polarymetru, tak aby całkowicie wypełnić rurkę. Nasunąć szkiełko tak, aby nie utworzył się bąbelków powietrza i zakręcić nakrętkę. Umieścić rurkę w polarymetrze. Te czynności należy wykonywać szybko, aby pierwszy pomiar kąta skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego można było przyjąć za odpowiadający  $t = 0$ . Natychmiast dokonać pierwszego pomiaru, zanotować czas. W odstępach półgodzinnych (każdorazowo zapisując dokładny czas) dokonać kolejnych pomiarów (co najmniej 6).

## OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Należy określić aktywność enzymatyczną inwertazy w 1 ml wyjściowego (nierozcieńczonego) preparatu enzymu.

Wyprowadzenie równania pozwalającego na określenie ilości sacharozy, glukozy i fruktozy w mieszaninie reakcyjnej na podstawie kątów skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego.

Skręcalności właściwe  $[\alpha]_D^{20}$  D-sacharozy, D-glukopiranozy i D-fruktofuranoy, które oznaczymy jako:  $[\alpha]_{Ds}^{20}$ ,  $[\alpha]_{Dg}^{20}$ ,  $[\alpha]_{Df}^{20}$ , wynoszą:

dla D-sacharozy	$[\alpha]_{Ds}^{20}$	+66,0°
dla D-glukopiranozy	$[\alpha]_{Dg}^{20}$	+52,7°
dla D-fruktofuranoy	$[\alpha]_{Df}^{20}$	-92,0°

Kąt, o który zostaje skręcona płaszczyzna światła spolaryzowanego przechodzącego przez roztwór mieszaniny reakcyjnej, jest sumą kątów o jakie ta płaszczyzna zostaje skręcona przez sacharozę, przez glukozę i przez fruktozę znajdujące się w roztworze w momencie pomiaru.

$$(1) \quad \alpha = \alpha_s + \alpha_g + \alpha_f$$

Przypomnijmy wzór definiujący skręcalność właściwą. Skręcalność właściwa to kąt o jaki skręcałaby płaszczyznę światła spolaryzowanego jednodecymetrowa warstwa roztworu o stężeniu 1 g/ml. A więc:

$$(2) \quad [\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha(^{\circ}) \cdot 100}{l(dm) \cdot c(g/100ml)}$$

gdzie:  $[\alpha]_D^{20}$  – skręcalność właściwa rozpuszczonej substancji wyrażona w stopniach;  $\alpha$  – zmierzony kąt skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego wyrażony w stopniach;  $l$  – grubość warstwy roztworu, przez którą przechodzi światło wyrażona w dm (długość rurki polarymetru wynosi 20 cm);  $c$  – stężenie procentowe roztworu (w/o) wyrażone w g/100 ml. Z przekształcenia tego wzoru otrzymujemy równanie:

$$(3) \quad \alpha = \frac{l \cdot c \cdot [\alpha]_D^{20}}{100}$$

A więc kąty skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego przez sacharozę, glukozę i fruktozę obecne w danym momencie w roztworze będą odpowiednio wynosiły:

$$\alpha_s = \frac{l \cdot c_s \cdot [\alpha]_{Ds}^{20}}{100}, \quad \alpha_g = \frac{l \cdot c_g \cdot [\alpha]_{Dg}^{20}}{100}, \quad \alpha_f = \frac{l \cdot c_f \cdot [\alpha]_{Df}^{20}}{100}$$

Podstawiając te dane do równania (1) otrzymujemy:

$$(4) \quad \alpha = \frac{l \cdot c_s \cdot [\alpha]_{Ds}^{20}}{100} + \frac{l \cdot c_g \cdot [\alpha]_{Dg}^{20}}{100} + \frac{l \cdot c_f \cdot [\alpha]_{Df}^{20}}{100}$$

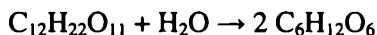
Wiemy, że rurka naszego polarymetru ma długość 20 cm; wiemy również, że w każdym momencie reakcji stężenie procentowe glukozy jest równe stężeniu procentowemu fruktozy. Korzystając z tych danych przekształcamy równanie (4):

$$(5) \quad \alpha = \frac{c_s \cdot [\alpha]_{D_s}^{20} + c_g ([\alpha]_{D_g}^{20} + [\alpha]_{D_f}^{20})}{50}$$

W równaniu (5) mamy dwie niewiadome: stężenie sacharozy i stężenie glukozy. Wiadomo jednak, że te dwie wielkości są ze sobą związane: im więcej sacharozy ulegnie hydrolizie, tym więcej w roztworze będzie glukozy. Ubytek 1 mola sacharozy oznacza pojawienie się 1 mola glukozy i 1 mola fruktozy. Ale w równaniu (5) występują stężenia procentowe a nie molowe! Gdybyśmy na chwilę (dla uproszczenia rozumowania) pominęli fakt, że podczas hydrolizy sacharozy następuje przyłączenie 1 cząsteczki wody mogliśmy napisać:

$$(6) \quad c_s = c_{s_0} - 2c_g$$

gdzie:  $c_s$ ,  $c_g$  to stężenia procentowe sacharozy i glukozy w danym momencie reakcji,  $c_{s_0}$  — początkowe stężenie procentowe sacharozy, w czasie  $t_0$ . Wartość  $c_{s_0}$  możemy łatwo wyliczyć z równania (3), przy założeniu, że w czasie  $t_0$ , w mieszaninie reakcyjnej nie ma ani glukozy ani fruktozy, a skręcenie płaszczyzny światła spolaryzowanego o kąt  $\alpha$  wynika tylko z obecności sacharozy (zwróć uwagę, że wyznaczona wartość powinna być bliska 10%, gdyż takie stężenie sacharozy przygotowano do doświadczenia). Równanie (6) to uproszczona zależność pomiędzy  $c_s$  a  $c_g$ . Postarajmy się ją teraz uściślić. Ponieważ równanie (6) dotyczy zmian zachodzących w tej samej objętości roztworu, możemy występujące w równaniu stężenia zastąpić przez ilości wyrażone w gramach. Korzystając z równania reakcji:



i podstawiając do tego równania liczby gramów odpowiadające masom cząsteczkowym poszczególnych reagentów otrzymujemy:

$$342 \text{ g} + 18 \text{ g} = 2 \times 180 \text{ g}; \quad \text{stad: } 342 \text{ g} = 360 \text{ g} - 18 \text{ g}$$

Łatwo zauważyć, że masa cząsteczkowa wody stanowi dokładnie 1/10 masy cząsteczkowej glukozy czy fruktozy, a na każdą utworzoną w wyniku hydrolizy cząsteczkę cukru prostego przypada pół cząsteczki wody. A więc jeśli w roztworze pojawiło się X g glukozy to znaczy, że uległo rozłożeniu nie 2X g sacharozy, jak wynikałoby z uproszczonego równania (6), lecz 1,9X g sacharozy. Pamiętając o tym, że w przypadku zmian zachodzących w tej samej objętości roztworu — te same zależności występują pomiędzy ilościami reagentów, a ich stężeniami, możemy uściślić równanie (6).

$$(7) \quad c_s = c_{s_0} - 1,9c_g$$

Podstawiając w równaniu (5) w miejsce  $c_s$  wyrażenie  $c_{s_0} - 1,9c_g$  otrzymujemy:

$$(8) \quad \alpha = \frac{(c_{s_0} - 1,9c_g)[\alpha]_{D_s}^{20} + c_g ([\alpha]_{D_g}^{20} + [\alpha]_{D_f}^{20})}{50}$$

a po dalszych przekształceniach (ze względu na  $c_g$ ):

$$(9) \quad c_g = \frac{50\alpha - c_{so}[\alpha]_{D_s}^{20}}{[\alpha]_{D_g}^{20} + [\alpha]_{D_f}^{20} - 1,9[\alpha]_{D_s}^{20}}$$

- Po wcześniejszym obliczeniu  $c_{so}$  równanie (9) ma tylko jedną niewiadomą ( $c_g$ ) i przedstawia zależność  $c_g$  w danym momencie reakcji od zmierzonego w tym momencie kąta skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego.
- Stosując równanie (3) obliczyć stężenie procentowe sacharozy w czasie  $t_0$ , a następnie korzystając z równania (9) obliczyć stężenia procentowe glukozy odpowiadające zmierzonym w półgodzinnych odstępach czasu kątom skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego.
- Wiedząc, że rurka polarymetru ma objętość 20 ml (a więc objętość mieszaniny reakcyjnej wynosi 20 ml) obliczyć ile mmoli glukozy powstało po  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ,  $t_4$ , itd.
- Wykreślić zależność ilości produktu od czasu trwania reakcji, przeprowadzić styczną do krzywej w czasie  $t_0$  i określić szybkość początkową reakcji enzymatycznej prowadzonej przez invertazę.
- Pamiętając, że liczba moli powstającej glukozy jest w tym przypadku równa liczbie moli rozkładanej sacharozy i jest równa ilości hydrolizowanych wiązań glikozydowych określić aktywność invertazy obecnej w mieszaninie reakcyjnej.
- Obliczyć aktywność enzymatyczną invertazy w 1 ml nierozcieńczonego preparatu enzymu. Należy pamiętać, że mieszaninę reakcyjną sporządzono przez zmieszanie 2 ml nierozcieńczonego preparatu enzymu z 20 ml roztworu substratu w buforze, ale w rurce polarymetru mieści się dokładnie 20 (a nie 22) ml. Dlatego też reakcja zachodziła przy udziale nie 2 lecz około 1,8 ml preparatu enzymu.

### **ODCZYNNIKI, MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:**

Inwertaza z drożdży wyizolowana jak w pkt. 5.3; 0,1 M bufor octanowy pH 4,7; 0,25 M roztwór sacharozy w buforze octanowym pH 4,7; 10% roztwór sacharozy w buforze octanowym pH 4,7; polarymetr.