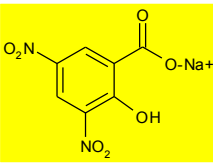
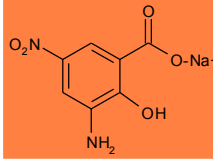


| TÉMA | SACHARIDY |
|-------------------|---|
| Úloha 21: | Izolácia kvasinkovej sacharázy |
| Princíp: | <p>Sacharáza (invertáza; systémový názov: β-D-fruktofuranozidfruktohydroláza; systémové číslo: EC 3.2.1.26) je enzým, ktorý štiepi sacharózu (okrem iných substrátov). Z jednej molekuly neredukujúcej sacharózy vznikajú 2 molekuly redukujúcich cukrov: D-glukózy a D-fruktózy.</p> $\text{sacharóza} \xrightarrow{\text{sacharáza}} \text{D-glukóza} + \text{D-fruktóza}$ <p>Vzniknutej ekvimolárnej zmesi glukózy a fruktózy hovoríme invertný cukor (invert).</p> <p>Michaelisova konštanta (K_m) pre sacharózu je $9,1 \times 10^{-3}$ M (v malátovom tlmivom roztoku, pH 4,6).</p> <p>Molekulová hmotnosť sacharázy z kvasiniek je 270 000 g/mol (270 kDa).</p> <p>Inhibitory: Enzým je inhibovaný kationmi ťažkých kovov (Ag^+, Cu^{2+}, Hg^{2+}). Je reverzibilne (vratným spôsobom) inhibovaný v nízkych koncentráciach močoviny, pri ktorých nedochádza k výrazným zmenám v štruktúre proteínu. Pri vysokých koncentráciach močoviny (8 M) dochádza k ireverzibilnej (nevratnej) inaktivácii, ktorá je sprevádzaná zmenami v sekundárnej a terciárnej štruktúre enzýmu.</p> <p>Stabilita: Je stabilný pri 4 °C, uskladnený v suchom stave. Vodný roztok enzýmu môže byť použitý po dobu niekoľkých týždňov, keď je uskladnený pri 4 °C.</p> <p>Kvasinková sacharáza nedifunduje cez bunkovú membránu, preto sa musí pred extrakciou rozrušiť rozotretím s kremenným pieskom.</p> |
| Reagencie: | <ol style="list-style-type: none"> 10 g pekárenského droždia kremenný piesok |
| Materiál: | trečia miska, centrifúga, centrifugačné skúmavky, kadička s objemom 100 ml |
| Postup: | 10 g čerstvého pekárenského droždia rozotrieme v trecej miske s troškou kremenného piesku. Pridávame po častiach 10 ml vody a rozotierame 5 min. Potom v niekoľkých dávkach pridáme ešte 20 ml vody a dobre premiešame. Suspenziu necháme stáť 30 min pri 25 – 30 °C. Potom ju 15 min centrifugujeme pri 3000 ot/min (1000 g). Supernatant prelejeme do čistej kadičky a použijeme na ďalšie stanovenia. |
| Úloha 22: | Stanovenie koncentrácie sacharázy Lowryho metódou |
| Princíp: | Pri Lowryho metóde bielkovina najprv reaguje s mednatými iónmi v alkalickej prostredí, pričom dochádza k ich redukcii na medné ióny. Následne dochádza účinkom medných iónov k redukcii kyseliny fosfomolybdeno-fosfovolfrámovej, ktorá je súčasťou Folinovho činidla. Finálny produkt tejto reakcie má modré sfarbenie. |
| Reagencie: | <ol style="list-style-type: none"> roztok A: 2 % uhličitan sodný v 0,1 M hydroxide sodnom roztok B: 0,5 % pentahydrát síranu mednatého v 1 % tetrahydráte vánanu sodnodraselného (roztoky A, B zmiešame max. 4 hod. pred cvičením v pomere 50:1) Folinovo činidlo štandardný roztok bielkoviny (hovädzí albumín) s koncentráciou 50 mg/100 ml Britton tlmivý roztok (0,1 M acetátový tlmivý roztok) s pH 5,0 vzorka izolovanej sacharázy |
| Materiál: | sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nastavcom, absorpčný spektrofotometer, plastové kyvety, laboratórna trepačka |

| | | | | | | | |
|-------------------------------------|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| Postup: | Na stanovenie koncentrácie sacharázy použijeme štandard hovädzieho albumínu s koncentráciou 50 mg/100 ml. Do označených skúmaviek pipetujeme roztok štandardu podľa tabuľky 3.4 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených. Do skúmavky so vzorkou pipetujeme namiesto štandardu 1 ml nariedeného roztoku sacharázy. Riedime acetátovým tlmivým roztokom s pH 5,0 , a to nasledovne: 1 ml roztoku izolovanej sacharázy + 4 ml tlmivého roztoku (5-násobné zriedenie). | | | | | | |
| TABUĽKA 3.4 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | vzorka |
| štandard albumínu [ml] | – | 0,05 | 0,10 | 0,25 | 0,50 | 0,75 | – |
| sacharáza (zriedená) [ml] | – | – | – | – | – | – | 1 |
| destilovaná H ₂ O [ml] | 1 | 0,95 | 0,90 | 0,75 | 0,50 | 0,25 | – |
| A + B (50:1) [ml] | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | premiešať nechať 10 min reagovať | | | | | | |
| Folinovo činidlo [ml] | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| | premiešať nechať 30 min reagovať určiť absorbanciu pri 750 nm | | | | | | |
| množstvo bielkoviny v skúmavke [mg] | 0 | 0,025 | 0,050 | 0,125 | 0,250 | 0,375 | xs |
| absorbancia pri 750 nm | – | | | | | | |
| Vyhodnotenie: | Pomocou kalibračných roztokov (skúmavky 1 až 5) zostrojíme kalibračný graf (závislosť absorbancie štandardného roztoku hovädzieho albumínu pri 750 nm od množstva) a z neho určíme množstvo vyizolovanej sacharázy v mg na 1 ml vzorky (xs) . Pre správne určenie jej koncentrácie je potrebné vynásobiť hodnotu xs zriedením pôvodného roztoku sacharázy. | | | | | | |
| Úloha 23: | Stanovenie aktivity sacharázy na základe redukujúcich sacharidov | | | | | | |
| Princíp: | <p>Enzymová aktivita je mierou množstva aktívneho enzýmu prítomného v roztoku. Uvádza sa v jednotkách 1 U (unit), príp. 1 kat (katal). 1 U predstavuje množstvo enzýmu, ktoré katalyzuje pri saturácii substrátom premenu 1 μmol substrátu za 1 min. 1 kat sa rovná množstvu enzýmu, ktoré premení 1 mol substrátu za 1 s. 1 U odpovedá 16,67 nkat (nanokatal).</p> <p>K stanoveniu aktivity sacharázy možno využiť dve metódy:</p> <p>a) polarimetrická metóda je založená na zmenách optickej otáčavosti roztoku ("inverzia" sacharózy).</p> <p>b) spektrofotometrická metóda využíva redukčné vlastnosti jedného z reakčných produktov, a to D-glukózy. Tá v alkalickom prostredí a pri zvýšenej teplote (100 °C) redukuje 3,5-dinitrosalicylát (DNS) na 3-amino-5-nitrosalicylát, čo sa prejaví zmenou sfarbenia roztoku zo žltej na tmavooranžovú farbu:</p> | | | | | | |
| | <div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="text-align: center;"> <chem>O=C[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)CO</chem> D-glukóza </div> <div style="margin: 0 10px;">+</div> <div style="text-align: center;">  3,5-dinitrosalicylát sodný (DNS) </div> <div style="margin: 0 10px;">+</div> <div style="text-align: center;"> 3 NaOH </div> <div style="margin: 0 10px;">→</div> <div style="text-align: center;"> <chem>[O-]C(=O)[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)CO</chem> D-glukonát sodný </div> <div style="margin: 0 10px;">+</div> <div style="text-align: center;">  3-amino-5-nitrosalicylát sodný </div> <div style="margin: 0 10px;">+</div> <div style="text-align: center;"> 2 H₂O </div> </div> | | | | | | |
| | Sacharidy s keto skupinou (fruktóza) môžu v rámci svojej otvorenej formy izome- | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|--|---|---|------------|------------|------------|------------|-----------|----------|
| | <p><i>rizovať skrz sériu tautomérnych premiestnení, pričom vzniká aldehydová skupina. Takže, aj keď sa vo všeobecnosti ketózy považujú za redukujúce sacharidy, v skutočnosti je to ich izomér s aldehydovou skupinou, ktorý je redukujúci. Bez tejto izomerizácie ketóny nemôžu byť oxidované. K tomuto typu izomerizácie dochádza v alkalickom prostredí pri zvýšenej teplote (100 °C). Aktivitu sacharázy možno vypočítať na základe množstva vzniknutých redukujúcich sacharidov (invertu) za jednotku času.</i></p> | | | | | | | |
| Reagencie: | <ol style="list-style-type: none"> 0,1 M acetátový tlmivý roztok ($\text{CH}_3\text{COONa} + \text{CH}_3\text{COOH}$) s pH 5,0 štandardný roztok redukujúcich sacharidov s koncentráciou 200 mg/100 ml (100 mg fruktózy a 100 mg glukózy v 100 ml vodného roztoku, čo predstavuje roztok s molárnou koncentráciou invertného cukru 0,0056 M) zásobný roztok sacharózy s koncentráciou 0,5 M roztok sacharázy z úlohy 21 získaný zriedením supernatantu acetátovým tlmivým roztokom s pH 5,0 roztok DNS (3,5-dinitrosalicylát), ktorý pripravíme zmiešaním 8 g NaOH, 5 g kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej a 150 g vlnanu sodnodraselného v 1000 ml roztoku (výsledné molárne koncentrácie sú 0,2 M NaOH, 22 mM DNS a 0,5 M vlnan sodnodraselný). | | | | | | | |
| Materiál: | sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nastavcom, absorpčný spektrofotometer, plastové kyvety, laboratórna trepačka, vodný kúpeľ | | | | | | | |
| Postup: | <p>A. Kalibračný graf pre stanovenie množstva invertného cukru Na stanovenie množstva invertného cukru (ekvimolárna zmes glukózy a fruktózy) použijeme štandardný roztok obsahujúci zmes glukózy a fruktózy s celkovou koncentráciou 200 mg/100 ml. Do označených skúmaviek pipetujeme roztok štandardu podľa tabuľky 3.5 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených.</p> | | | | | | | |
| TABUĽKA 3.5 | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| štandard glukózy a fruktózy | [ml] | – | 0,4 | 0,8 | 1,2 | 1,6 | 2 | |
| destilovaná H_2O | [ml] | 3 | 2,6 | 2,2 | 1,8 | 1,4 | 1 | |
| DNS | [ml] | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | | premiešať 8 min nechať reagovať vo vodnom kúpeli pri 100 °C ochladiť na laboratórnu teplotu určiť absorbanciu pri 540 nm | | | | | | |
| množstvo invertu v skúmavke | [mg] | 0 | 0,8 | 1,6 | 2,4 | 3,2 | 4 | |
| látkové množstvo invertu | [μmol] | 0 | 2,2 | 4,4 | 6,7 | 8,9 | 11 | |
| absorbancia pri 540 nm | | – | | | | | | |
| | <p>B. Závislosť aktivity sacharázy od koncentrácie substrátu Do označených skúmaviek pipetujeme zásobný roztok sacharózy s koncentráciou 0,5 M podľa tabuľky 3.6 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených.</p> | | | | | | | |
| TABUĽKA 3.6 | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 0,5 M roztok sacharózy | [ml] | 0,5 | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| 0,1 M acetátový tlmivý roztok (pH 5,0) | [ml] | 0,5 | 0,85 | 0,8 | 0,7 | 0,6 | 0,5 | 0,4 |
| | | premiešať | | | | | | |
| sklenenou pipetou rýchlo pridať postupne do každej skúmavky roztok sacharázy, obsah skúmavky premiešať a súčasne zaznamenať čas : | | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| sacharáza (zriedená) [ml] | – | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| po uplynutí 10 min (pre každú skúmavku osobitne): | | | | | | | |
| DNS [ml] | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| premiešať | | | | | | | |
| destilovaná H ₂ O [ml] | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| premiešať 8 min nechať reagovať vo vodnom kúpeli pri 100 °C ochladiť na laboratórnu teplotu určiť absorbanciu pri 540 nm | | | | | | | |
| začiatočná koncentrácia substrátu (sacharózy) v 1 ml [M] | – | 0,025 | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 |
| absorbancia pri 540 nm | – | | | | | | |
| látkové množstvo invertu (glukóza + fruktóza) v skúmavke [μmol] | – | x ₁ | x ₂ | x ₃ | x ₄ | x ₅ | x ₆ |
| aktivita sacharázy [U/ml] | – | a ₁ | a ₂ | a ₃ | a ₄ | a ₅ | a ₆ |
| roztok v skúmavke s označením „0“ použijeme pri meraní absorbancie ako referenciu | | | | | | | |
| Vyhodnotenie: | <p>A. Pomocou kalibračných roztokov (skúmavky 1 až 5 v tabuľke 3.5) zostrojíme kalibračný graf (závislosť absorbancie štandardného roztoku zmesi glukózy a fruktózy – invertu – od látkového množstva v μmol).</p> <p>B. Z kalibračného grafu v časti A zistíme látkové množstvá sacharázou vzniknutého invertného cukru (x₁ až x₆, tabuľka 3.6).</p> <p>Následne z týchto údajov o množstve vypočítame aktivitu sacharázy (a₁ až a₆, tabuľka 3.6) a prepočítame na 1 ml pôvodného neriedeného enzýmového preparátu.</p> <p>Zostrojíme grafickú závislosť aktivity sacharázy (os y) od začiatočnej koncentrácie substrátu (os x).</p> <p>Príklad výpočtu aktivity a špecifickej aktivity sacharázy: Predpokladajme, že za daných podmienok (20 °C, pH 5,0), 0,1 ml riedeného enzýmu uvoľní za 10 min reakcie 2,2 μmol invertu (ekvimolárna zmes glukózy a fruktózy). Údaj 2,2 μmol bol získaný z kalibračného grafu v časti A. V tom prípade by sa pôsobením 1 ml použitého riedeného enzýmu za 1 min uvoľnilo: $\frac{2,2 \mu\text{mol}}{10 \text{ min}} \times 10 = 2,2 \mu\text{mol invertu/min}$ 1 ml pôvodného (neriedeného) enzýmu by v našom prípade (5-násobné zriedenie) uvoľnilo 5-krát viac invertu: $2,2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \times 5 = 11 \mu\text{mol invertu/min}$ Keďže pre medzinárodné stanovenú enzýmovú jednotku (U) platí (viď Princíp k tejto úlohe): 1 U = 1 μmol substrátu, resp. produktu za minútu, predstavuje vypočítaný údaj hodnotu aktivity.</p> <p>Záver: 1 ml pôvodného preparátu sacharázy má aktivitu zodpovedajúcu za podmienok použitej metódy (20 °C, pH 5,0) 11 μmol/min, t.j. 11 U.</p> <p>Ak by sme chceli zistiť špecifickú aktivitu enzýmu, potrebovali by sme na to údaj o množstve enzýmu v mg/ml (viď úloha 22). Predpokladajme, že množstvo enzýmu v pôvodnom preparáte je 0,5 mg/ml. V tom prípade by sa špecifická aktivita počítala nasledovne: $\frac{11 \frac{\text{U}}{\text{ml}}}{0,5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}} = 22 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$ Záver: Špecifická aktivita vyzolovanej sacharázy je za vyššie uvedených podmienok 22 U/mg.</p> | | | | | | |

| Úloha 24: | | Vplyv pH na aktivitu sacharózy | | | | | | |
|--|---|---------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| Reagencie: | 1. 0,1 M acetátové tlmivé roztoky ($\text{CH}_3\text{COONa} + \text{CH}_3\text{COOH}$) s pH 3,6; 4,6; 5,3 a 5,9 2. 0,1 M roztok kyseliny chlorovodíkovej (pH 1,8) 3. 1 % roztok hydroxidu sodného (pH 13) 4. 0,5 M zásobný roztok sacharózy 5. roztok sacharózy z úlohy 21 získaný zriedením supernatantu acetátovým tlmivým roztokom s pH 5,0 | | | | | | | |
| Materiál: | sada skúmaviek, stojan na skúmavky, sklenené pipety s nadstavcom, absorpčný spektrofotometer, plastové kyvety, laboratórna trepačka, vodný kúpeľ | | | | | | | |
| Postup: | Do označených skúmaviek pipetujeme zo zásobného roztoku sacharózy s koncentráciou 0,5 M podľa tabuľky 3.7 a postupujeme podľa pokynov v nej uvedených. | | | | | | | |
| TABUĽKA 3.7 | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 0,5 M sacharóza [ml] | | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| acetátový tlmivý roztok | pH | 3,6 | – | 3,6 | 4,6 | 5,3 | 5,9 | – |
| | objem [ml] | 0,9 | – | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | – |
| 0,1 M HCl [ml] | | – | 0,8 | – | – | – | – | – |
| 1 % NaOH [ml] | | – | – | – | – | – | – | 0,8 |
| premiešať | | | | | | | | |
| sklenenou pipetou rýchlo pridať postupne do každej skúmavky roztok sacharózy, skúmavku premiešať a súčasne zaznamenať čas : | | | | | | | | |
| sacharóza (zriedená) [ml] | | – | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| po uplynutí 10 min (pre každú skúmavku osobitne): | | | | | | | | |
| DNS [ml] | | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| premiešať | | | | | | | | |
| destilovaná H_2O [ml] | | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| premiešať 8 min nechať reagovať vo vodnom kúpeli pri 100 °C ochladiť na laboratórnu teplotu určiť absorbančiu pri 540 nm | | | | | | | | |
| pH | | – | 1,8 | 3,6 | 4,6 | 5,3 | 5,9 | 13 |
| absorbancia pri 540 nm | | – | | | | | | |
| látkové množstvo invertu (glukóza + fruktóza) v skúmavke [μmol] | | – | x'_1 | x'_2 | x'_3 | x'_4 | x'_5 | x'_6 |
| aktivita sacharózy [U/ml] | | – | a'_1 | a'_2 | a'_3 | a'_4 | a'_5 | a'_6 |
| roztok v skúmavke s označením „0“ použijeme pri meraní absorbancie ako referenciu | | | | | | | | |
| Vyhodnotenie: | Z kalibračného grafu v úlohe 23 (časť A) zistíme látkové množstvá invertného cukru (x'_1 až x'_6 , tabuľka 3.7). Vypočítame aktivitu sacharózy (a'_1 až a'_6 , tabuľka 3.7) a zostrojíme grafickú závislosť aktivity sacharózy (os y) od pH (os x). Názorný príklad výpočtu aktivity je uvedený vo vyhodnotení v úlohe 23 . | | | | | | | |