

Instrukcja

## **Analiza aktywności enzymatycznej preparatów zawierających ekstrakty enzymów trawiennych**

### **1. Ogólna instrukcja wykonania ćwiczenia**

Celem ćwiczenia jest:

- potwierdzenie występowania aktywności enzymatycznej w przygotowanym ekstrakcie
- wyznaczenie optymalnych warunków aktywności enzymatycznej enzymu w zakresie:
  - pH
  - temperatury
  - stężenia ekstraktu
- wpływu immobilizacji enzymu na jego aktywność

## **Analiza aktywności enzymatycznej preparatów zawierających ekstrakty enzymów trawiennych**

### **2. Potwierdzenie aktywności amylazy w badanych ekstraktach**

#### **Przygotowanie 1 % kleiku skrobiowego**

1,0 g skrobi zawiesić w 80 mL wody.

Zawiesinę zagotować aż do uzyskania jednorodnej mieszaniny.

Mieszaninę schłodzić na lodzie i uzupełnić buforem do 100 mL.

#### **Przygotowanie krzywej wzorcowej dla pomiarów**

1 mg/mL maltoza

1 % NaCl

1 % kwas dinitrosalicylowy (DNS) w 0,4 M NaOH

Dla 10 rozcieńczeń seryjnych maltozy przygotować w 14 mL falkonach roztwory:

- 500  $\mu$ L roztworu maltozy
- 500  $\mu$ L wody
- 100  $\mu$ L NaCl
- 100  $\mu$ L roztworu DNS

Gotować przez 5 min.

Schłodzić na lodzie.

Zmierzyć absorbancję przy 540 nm.

#### **Test z płynem Lugola**

płyn Lugola

0,1 M bufor octanowy pH 6,5

1 % NaCl

Ekstrakt enzymatyczny

Przygotować 5 rozcieńczeń seryjnych dla nierozcieńczonego ekstraktu enzymatycznego.

Do eppendorfów rozpipetować:

- 500,0  $\mu$ L kleiku skrobiowego
- 500,0  $\mu$ L buforu
- 100,0  $\mu$ L 1% NaCl

Do roztworu wkraplać rozcieńczony 1:1 płyn Lugola aż do zabarwienia roztworu.

Dodać 100,0  $\mu$ L ekstraktu enzymatycznego.

Zmierzyć czas aż do osiągnięcia punktu achromowego.

Instrukcja

## **Analiza aktywności enzymatycznej preparatów zawierających ekstrakty enzymów trawiennych**

### **Test z kwasem dinitrosalicylowym**

1 % kwas dinitrosalicylowy (DNS) w 0,4 M NaOH

0,1 M bufor octanowy

1 % NaCl

Rozcieńczmy ekstrakt enzymatyczny (patrz punkt wyżej)

W falkonach o pojemności 14 mL przygotować roztwory

- 500  $\mu$ L kleiku skrobiowego
- 500  $\mu$ L 0,1 M buforu
- 100  $\mu$ L 1% NaCl
- 100  $\mu$ L rozcieńzonego ekstraktu enzymatycznego

Mieszaninę reakcyjną inkubować przez czas 2x dłuższy od koniecznego do osiągnięcia punktu achromowego.

Dodać 100  $\mu$ L DNS i gotować przez 5 min.

Schłodzić na lodzie.

Zmierzyć absorbancję przy 540 nm.

Dla najlepszego, najgorszego i neutralnego pH określić wpływ temperatury.

(Wykonać analogiczny test enzymatyczny przy czym mieszaninę reakcyjną inkubować: na lodzie, w temp. pokojowej, cieplarni, łaźni wodnej.)

Dla najlepszego, najgorszego i neutralnego pH oraz optymalnej temperatury sprawdzić aktywność immobilizowanej mieszaniny enzymatycznej.

(Wykonać analogiczny test enzymatyczny przy czym mieszaninę reakcyjną inkubować w optymalnej temperaturze.)

Otrzymane wyniki odnieść w oparciu o krzywą wzorcową do ilości zhydrolizowanej maltozy.

## **Analiza aktywności enzymatycznej preparatów zawierających ekstrakty enzymów trawiennych**

### **3. Potwierdzenie aktywności lipazy w badanych ekstraktach**

#### **Przygotowanie wzorca pH dla wskaźników**

0.2 % roztwór błękitu bromotymolowego (BBT)

0.2% roztwór czerwieni o-krezolowej (COK)

0.1 M bufor octanowy pH 4.0-6.5

Przygotować odpowiednio:

0.05 % roztwór BBT w wodzie

0.10 % roztwór COK w wodzie

Przygotować roztwory:

- 100.0  $\mu$ L buforu
- 100.0  $\mu$ L wskaźnika
- 1300.0  $\mu$ L wody

Wykonać pomiar widma UV-Vis w zakresie 300-700 nm.

Zidentyfikować pasma związane z formami granicznymi wskaźników

Wyznaczenie optymalnych parametrów pracy badanego enzymu

#### **Test z wybranym substratem**

0.1 M bufory octanowe

0.1 M NaOH

1 % NaCl

Ekstrakt enzymatyczny

Wskaźniki pH

W eppendorfach o pojemności 2 mL przygotować roztwory

- 100  $\mu$ L substratu
- 100  $\mu$ L 0,1 M buforu
- 100  $\mu$ L wskaźnika
- 100  $\mu$ L 1% NaCl
- 100  $\mu$ L ekstraktu enzymatycznego
- 1000  $\mu$ L wody

UWAGA: dla każdego pH przygotować ślełą próbę zastępując enzym wodą!

UWAGA: po dodaniu wszystkich składników próbki dokładnie worteksować.

Mieszanię reakcyjną inkubować przez 30 min.

Dodać 100  $\mu$ L 96 % EtOH.

Instrukcja

### **Analiza aktywności enzymatycznej preparatów zawierających ekstrakty enzymów trawiennych**

Do próbki z enzymem dodawać stopniowo 0.5-0.1 M NaOH do momentu zaobserwowania zmiany zabarwienia. Równą objętość NaOH dodać do ślepej próby.

Próbki wirować przez 5 min przy max prędkości.

Zmierzyć absorbancję przy zidentyfikowanych długościach fali.

Różnica absorbancji pomiędzy ślepą a aktywną próbką jest miarą aktywności enzymu.

Dla najlepszego, najgorszego i neutralnego pH określić wpływ temperatury.

(Wykonać analogiczny test enzymatyczny przy czym mieszaninę reakcyjną inkubować: na lodzie, w temp. pokojowej, cieplarnie, łaźni wodnej.)

Dla najlepszego, najgorszego i neutralnego pH oraz optymalnej temperatury sprawdzić aktywność immobilizowanej mieszaniny enzymatycznej.

(Wykonać analogiczny test enzymatyczny przy czym mieszaninę reakcyjną inkubować w optymalnej temperaturze.)

Otrzymane wyniki przedstawić w funkcji pH i temperatury.

Instrukcja

## **Analiza aktywności enzymatycznej preparatów zawierających ekstrakty enzymów trawiennych**

### **4. Potwierdzenie aktywności proteolitycznej w badanych ekstraktach**

0.1 M NaOH

0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

6.0 % roztwór żelatyny w 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

0.1 M bufor octanowy (pH 4.0, 5.0, 6.0)

0.2 % roztwór błękitu bromotymolowego (BBT)

0.2% roztwór czerwieni o-krezolowej (COK)

ekstrakty enzymatycznego

Przygotować test enzymatyczny:

- 900.0 uL ekstraktu
- 3450.0 uL 6% roztworu żelatyny
- 150.0 uL 0.1 M buforu octanowego lub 0.1 M NaOH

Pobrać 500.0 uL mieszaniny do 5 eppendorfów i inkubować mieszaninę przez 0, 5, 15, 30, 60 min. Dodać 100.0 uL wskaźnika. Miareczkować roztworem NaOH do zmiany zabarwienia.

W kolejnych pomiarach punktów czasowych używać tej samej ilości NaOH.

Zmierzyć widmo UV-Vis i zanotować wyniki.

Porównać wyniki dla badanych ekstraktów.

Instrukcja

## **Analiza aktywności enzymatycznej preparatów zawierających ekstrakty enzymów trawiennych**

### **5. Immobilizacja enzymów w alginianie**

Alginian sodu

3% CaCl<sub>2</sub>

strzykawka

sitko

ekstrakt enzymatyczny

0,16 g alginianu sodu zawiesić w 4 mL wody. Dokładnie wymieszać i zostawić na 15 min. w celu odpowietrzenia.

Dodać 1,5 mL ekstraktu enzymatycznego i wymieszać.

Do zlewki ze 100,0 mL 3% CaCl<sub>2</sub> mieszając(!) wkraplać za pomocą strzykawki przygotowaną mieszaninę.

Pozostawić na mieszadle przez 30 min.

Odcedzić na sitku.

Do dalszych badań użyć od 2 do 5 kulek po uprzednim zważeniu.