

LABORATORIO DI SCIENZE NATURALI

ESPERIENZA: L'INVERTASI E L'IDROLISI DEL SACCAROSIO

Indice dei contenuti

- Obiettivo
- Introduzione
 - L'enzima
 - Il substrato
 - L'idea portante dell'esperimento
- Lista dei reagenti e degli strumenti
- Procedure
 - Scheda per lo studente
- Note
 - La reazione del saggio di Fehling
- Dati
- Domande
- Commenti
-
- Bibliografia/ sitografia

OBIETTIVO:

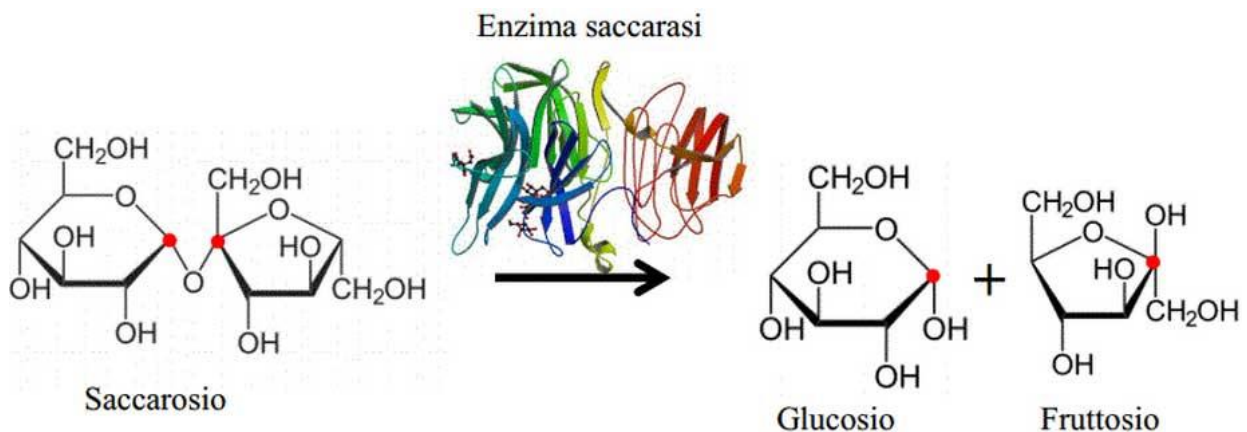
ISOLARE L'INVERTASI DA COLTURE DIVERSE DI LIEVITI E PROVARNE L'ATTIVITA' SUL SACCAROSIO COMPIENDO OSSERVAZIONI SEMIQUANTITATIVE.

COMPIERE MISURE STRUMENTALI PER DETERMINARE LE CONDIZIONI IN CUI L'ENZIMA E' PIU' EFFICIENTE

INTRODUZIONE

L'enzima

L'invertasi, o β -fructofuranosidasi, è una idrolasi (E.C. 3.2.1.26) attiva sul substrato saccarosio e capace di degradare quindi il saccarosio in glucosio e fruttosio secondo la reazione



Questa reazione può avvenire anche in presenza di acidi (ad esempio acido cloridrico) a temperature intorno ai $70^{\circ}\text{--}80^{\circ}\text{C}$ per alcune ore : è proprio dal confronto con queste condizioni che risalta l'efficacia dell'azione dell'enzima invertasi (infatti si ottengono risultati significativi già a T ambiente, anche se la T ottimale per l'enzima è attorno ai 37°C)

L'invertasi viene prodotta da molti altri organismi che possono in questo modo utilizzare il saccarosio come nutriente: viene ad esempio utilizzata dalle api e anche in noi umani, nell'intestino crasso, ci sono cellule (chiamate di Paneth) che producono questo enzima.

Il substrato

Il saccarosio è uno dei più noti disaccaridi, composto da un α -D-glucosio e un β -D-fruttosio : il legame chimico tra i due monosaccaridi interessa entrambi i C anomerici (C1 del glucosio e C2 del fruttosio), per cui il saccarosio, pur essendo formato da due zuccheri riducenti, non ha questa proprietà.

Quando il legame α (1 \rightarrow 2)glucosidico viene rotto sia ha un cambiamento nelle proprietà ottiche della soluzione: il saccarosio è infatti destrogiro, con un potere rotatorio specifico di $+66,5^{\circ}$, mentre la miscela risultante è levogira , -20° , in quanto è equimolecolare in D-glucosio, $+52,5^{\circ}$, e D-fruttosio, -92° . Per questo motivo la miscela che si ottiene dall'idrolisi del saccarosio viene chiamata *zucchero invertito*.

Lo zucchero invertito ha un notevole utilizzo nell'industria alimentare, soprattutto in pasticceria e gelateria in quanto ha una affinità con l'acqua più alta del saccarosio e quindi aiuta a rendere le torte più morbide; inoltre ritarda o evita la cristallizzazione e viene adoperato pertanto per le glasse.

L'idea portante dell'esperimento

Utilizzando colture di lieviti (anche diversi) vogliamo ottenere una soluzione di invertasi. L'efficacia dell'azione degli enzimi sarà testata utilizzando il saggio di Fehling, che risulta positivo soltanto per gli zuccheri riducenti. In seguito alla reazione di idrolisi, quindi, il campione di substrato "elaborato" dall'enzima darà un risultato positivo. L'intensità della colorazione della provetta potrà anche darci una idea della quantità di zuccheri riducenti effettivamente prodotta.

Sarà necessario, per poter correttamente interpretare i dati, verificare preliminarmente che

- la soluzione di saccarosio non dà risultato positivo al Fehling
- la soluzione di invertasi non contiene di per sè zuccheri riducenti e quindi non dà risultato positivo al Fehling



Sarà inoltre condotta una prova in bianco, per avere un riferimento per la colorazione da ottenere in caso di risultato positivo (con un campione contenente glucosio).

Se la procedura per l'estrazione darà buoni risultati e si otterrà una quantità opportuna di invertasi, si potrebbero poi condurre anche prove in cui si varia la concentrazione dell'enzima (non potendo quantificare in valore assoluto, faremo diluzioni in serie – 100%,50%,25%,12,5%,6,25%).

Infine si potrebbe provare l'effetto di un forte riscaldamento della soluzione di enzimi con la conseguente probabile denaturazione.

LISTA DEI REAGENTI E DEGLI STRUMENTI

Reagenti

- Bustine lievito disidratato/ panetti di lievito fresco
- Saccarosio (commerciale)
- D-glucosio
- Acqua distillata
- Reattivo di Fehling A  H 411, P 273, P391, P501
- Reattivo di Fehling B  H 314, H318, P264,P280,P301+330+331, P303+361+353, P304+340,P305+351+338

Strumenti

- Portaprovette e set di 10 provette
- becher 50 mL (per soluzione invertasi, saccarosio e glucosio)
- pipette tarate da 10 mL
- Spruzzetta con acqua distillata
- Bagno termico
- Becher da 200 mL per la coltura di lieviti

SCHEDA PER LO
STUDENTEL'invertasi e l'idrolisi del
saccarosio

OPERAZIONI PRELIMINARI

MATERIALE

STRUMENTAZIONE E
VETRERIA

PROCEDIMENTO

**Nelle varie fasi è importante
la "pulizia": ogni soluzione
deve avere una pipetta
dedicata (tarata o normale)**

**SCHEDA DI LABORATORIO: materiali,
strumentazione e procedura**

Prima di iniziare l'esperimento vero e proprio è necessario ottenere l'invertasi da una coltura di lieviti.

Si scioglie il contenuto di una bustina di lievito liofilizzato (circa 7 g) in 80 mL di acqua distillata e si lascia riposare per 20 minuti a T ambiente (gli ultimi 5 minuti su piastra magnetica con agitatore).

- Soluzione di saccarosio all'1%
- Soluzione di glucosio al 2%
- Reattivo di Fehling A e B
- Acqua distillata
- Soluzione di invertasi

- Portaprovette e set di provette
- 3 becher da 50 mL
- 3 pipette tarate da 10 mL
- Spruzzetta con acqua distillata
- Bagno termico a 37°-40°C
- piastra termica
- Becher da 200 mL

PROVE DI CONTROLLO- PROVA IN BIANCO

In questa fase si deve verificare che la soluzione di saccarosio e la soluzione di invertasi non contengano zuccheri riducenti " di per sè", fatto che inficierebbe il nostro esperimento.

Si prelevano quindi dal docente o dal tecnico di laboratorio

- 15 mL di soluzione di invertasi
- 15 mL di soluzione di saccarosio
- 15 mL di soluzione di glucosio

Si immettono in provette numerate le seguenti soluzioni:

- Provetta n°1 : 6 mL di soluzione di invertasi + 2 mL di acqua distillata
- Provetta n°2: 6 mL di soluzione di acqua distillata e 2 mL di saccarosio
- Provetta n°3: 6 mL di soluzione di glucosio e 2 mL di acqua distillata

Si lasciano nel bagno termico per 8 minuti.

SCHEDA PER LO
STUDENTE**L'invertasi e l'idrolisi del
saccarosio**

Si esegue il saggio di Fehling sulle tre provette: si aggiungono 1 mL della soluzione A e della soluzione B in ogni provetta e la si sottopone a riscaldamento, immergendola in un becher pieno di acqua a T vicina all'ebollizione. Solo la provetta con il glucosio dà risposta positiva al saggio. Conservare la provetta positiva per il confronto con i campioni successivi.

STUDIO DELL'ATTIVITA' DELL'ENZIMA INVERTASI

Si preparano 5 provette e le si etichettano con i seguenti valori: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%. Si prepara una provetta per la diluizione.

Si prelevano 6 mL di soluzione di invertasi e le si immettono nella provetta 100%. Nella provetta per le diluizioni si ripete l'operazione e si aggiungono 6 mL di acqua distillata.

Si prelevano 6 mL da questa provetta e li si immettono nella provetta 50%. Nella provetta per la diluizione (in cui sono rimasti 6 mL di soluzione) si aggiungono 6 mL di acqua distillata e si prelevano, dopo qualche secondo, 6 mL di soluzione, che viene immessa nella provetta 25%.

Nella provetta per le diluizioni si aggiungono altri 6 mL di acqua distillata. Si prelevano 6 mL di soluzione e li si immettono nella provetta 12.5%. Si ripete un'ultima volta l'aggiunta di 6 mL di acqua distillata nella provetta per le diluizioni e si prelevano poi 6 mL di soluzione da immettere nell'ultima provetta, quella 6,25%.

In tutte le provette si aggiungono 2 mL di soluzione di saccarosio e si ripone il tutto nel bagno termico a 35°-40°C.

Dopo 8 minuti si esegue il saggio di Fehling su tutte le provette, aggiungendo in ognuna 1 mL di soluzione A e 1 mL di soluzione B. Si pongono le provette in un becher contenente acqua posto su una piastra termica (come per le prove di controllo 9 e si aspetta qualche minuto la comparsa della colorazione.

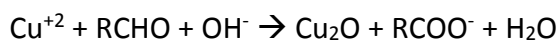
Si confrontano le colorazioni ottenute e le concentrazioni delle soluzioni di invertasi utilizzate. Per meglio fissare la situazione, conviene scattare alcune foto.

NOTE IN APPENDICE

LA REAZIONE DEL SAGGIO DI FEHLING

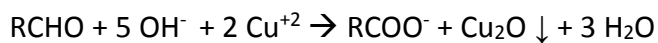
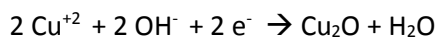
Reattivo di Fehling A: soluzione di CuSO_4

Reattivo di Fehling B. Soluzione di tartrato di sodio e potassio e soluzione di NaOH



RCHO: il C ha n° ox +1

RCOO⁻: il C ha n° ox +3



Cu_2O : precipitato rosso-arancio

COME ELABORARE I DATI

La rilevazione dell'attività dell'enzima nei confronti del substrato può essere compiuta confrontando le colorazioni delle soluzioni in seguito al saggio di Fehling. L'intensità della colorazione rosso arancio è un indice della quantità di zuccheri riducenti prodotti durante la reazione di idrolisi.

Può essere quindi utile a questo scopo raccogliere documentazione video, per poter più agevolmente confrontare i risultati ottenuti.

DOMANDE – SPUNTI PER L'APPROFONDIMENTO

- I risultati ottenuti sono in linea con le attese?
- Quali fattori potrebbero influire sulla reazione e, in conseguenza, sui risultati ottenuti?
- Quale potrebbe essere l'effetto di una variazione di T? Quale è la T ottimale per l'enzima invertasi?
- Può il pH influire sulla reazione di idrolisi?

Si potrebbe pensare di fissare come variabile indipendente la T al posto della concentrazione dell'enzima e condurre quindi una serie di rilevazioni variando la T di incubazione.

Altra nuova variabile indipendente potrebbe essere il pH, fissato con una serie di soluzioni tampone.

Si potrebbe realizzare anche una idrolisi acida e fare un confronto tra le condizioni necessarie (T, t, pH, concentrazioni dei reagenti...) per realizzare le due reazioni.


APPROFONDIMENTO PER IL TRIENNIO

In questa esperienza si sfrutta la reazione tra gli zuccheri riducenti prodotti dall'azione dell'invertasi sul saccarosio con un reattivo, l'acido 3,5-dinitrosalicilico (DNS). La forma ossidata e ridotta del DNS assorbono a lunghezze d'onda diverse. Si misura l'assorbanza a 540 nm (picco di assorbimento per la forma ridotta) e usando una retta di calibrazione si converte il dato in micromoli di zucchero ridotto.

Strumenti

- Spettrofotometro UV-vis
- Bagno termico a 30°C
- Cronometro
- Bagno maria – becher su piastra riscaldante
- Bagno di ghiaccio

Reagenti

- Soluzione tampone sodio acetato 0,05 M
- Soluzione saccarosio 1,8 M
- Soluzione fruttosio 0.005M
- Soluzione glucosio 0,005M
-
- Soluzione DNS (DNS  H 302, P301+312+330)
- Soluzione 0,035 glucosio/fruttosio in tampone acetato

Per la soluzione DNS: 100 mL di soluzione di DNS al 5% in 2M NaOH sono aggiunti a 250 mL di una soluzione al 60% di tartrato di sodio e potassio e portati a 500 mL. Conservare in contenitore scuro e tappato.

Per la soluzione di invertasi: si pesano 10 g di lievito di birra e si sciolgono in 30 mL di NaHCO_3 0,1 M, si incubano a bagno maria a 40°C per 24 h, si centrifuga e il decantato può rimanere stabile per mesi a 5°C. Diluire 1/1000 prima dell'uso

SCHEDA PER LO
STUDENTE**Determinazione per via
spettrofotometrica della
quantità di saccarosio in un
campione incognito****Strumenti**

- Spettrofotometro UV-vis
- Bagno termico a 30°C
- Cronometro
- Bagno maria – becher su piastra riscaldante
- Bagno di ghiaccio

Reagenti

- Soluzione tampone sodio acetato 0,05 M
- Soluzione contenente 0,005 M glucosio e 0,005 M fruttosio in pari volume
- Soluzione saccarosio 1,8 M
- Soluzione DNS (vedi preparazione)
- Soluzione glucosio /fruttosio 0,035 M in tampone acetato

Costruzione retta calibrazione**Triplicare la prova**

- si prende la soluzione contenente 0,005M glucosio e 0,005 fruttosio in uguale volume e si immettono i seguenti volumi all'interno di una serie di provette: [0], 0.4, 0.8, 1.6 e si porta a volume di 2 mL. Si aggiunge 1 mL di soluzione tampone.
- Dopo l'aggiunta di 2 mL di soluzione di DNS si mettono le provette in bagno maria all'ebollizione per 5 min. si raffredda in bagno di ghiaccio, si aggiungono 20 mL di acqua distillata.
- Si misura l'assorbanza a 540 nm. Si costruisce la retta di taratura.

Inibizione da substrato

- Si prende la soluzione 1,8 M di saccarosio e si riempiono delle provette in modo tale da avere un volume variabile di saccarosio tra 0 a 2 mL. Si porta, nel caso, a volume con acqua distillata (2 mL), annotando la quantità di soluzione di saccarosio adoperata. Si aggiunge 1 mL di soluzione tampone. Si porta a 40°C.
- Si aggiungono 2 mL di invertasi e si incuba a 40°C per almeno 10 min.
- Si aggiungono poi 2 mL di DNS, stoppando così l'attività dell'invertasi. Si procede come prima.

Inibizione da prodotti di reazione

- Si parte da una soluzione di saccarosio 0,25 M e si distribuiscono in una serie doppia di provette piccoli volumi, compresi tra 0 e 2 mL, portando poi tutto a volume di 2 mL con acqua e si aggiunge al primo set 1 mL di soluzione tampone e al secondo 1 mL di inibitore in soluzione tampone.
- Dopo aver portato a 40 °C le due serie di provette si procede come nei casi precedenti.

**Agitare durante il
riscaldamento**

Metodo polarimetrico

Avendo a disposizione un polarimetro si potrebbero compiere misure del potere rotatorio della soluzione di saccarosio prima e dopo l'azione dell'enzima invertasi, prendendo misure a intervalli regolari, es. 10 minuti, per un'ora.

Sitografia

<https://terpconnect.umd.edu/~nsw/ench485/lab14.htm>

<https://www.omicsgroup.org/journals/a-simplified-method-for-measuring-secreted-invertase-activity-in-saccharomyces-cerevisiae-2167-0501.1000151.pdf>

[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0307-4412\(88\)90072-6/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0307-4412(88)90072-6/pdf)

<https://www.colby.edu/chemistry/PChem/lab/InversionSucrose.pdf>