KINETYKA ENZYMATYCZNA

Badanie kinetyki reakcji enzymatycznej hydrolizy sacharozy w obecności inwertazy.

1. **Cel ćwiczenia.**

   1.1. Zapoznanie się z kinetyką reakcji enzymatycznej hydrolizy sacharozy w obecności enzymu inwertazy.

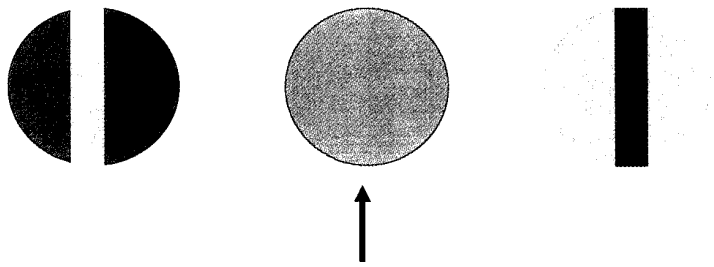
   1.2. Zaznajomienie się z obsługą półautomatycznego polarymetru POLAX-2 ATAGO.

   1.3. Wykonanie krzywych kinetycznych i wyznaczenie z nich wielkości kinetycznych: K_m, V_{max}, v_0, k_{kat}, wydajności katalitycznej, uwzględniając wpływ podanych przez prowadzącego, stężeń sacharozy i inwertazy.

2. **Wykonanie ćwiczenia.**

   2.1. Obsługa polarymetru. *

   Pole widzenia podzielone jest na ~~trzy~~ 2 części, które w zależności od położenia analizatora mają różny stopień zaciemnienia- ~~ciemny pasek na jasnym tle, lub jasny pasek na ciemnym tle (rysunek 1)~~. Zasada działania polarymetru polega na obróceniu analizatora o taki kąt, o jaki skręciła płaszczyznę światła spolaryzowanego (otrzymanego w polaryzatorze) badana substancja optycznie czynna (sacharoza). W momencie ustawienia analizatora tak, aby pole widzenia było jednolicie zaciemnione odczytuje się wartość kąta, będąca kątem skręcenia płaszczyzny polaryzacji światła przez substancję optycznie czynną.



Jednakowe zaciemnienie pól- odczyt kąta skręcenia płaszczyzny polaryzacji światła

Rysunek 1. Zmiany obrazu pola widzenia w polarymetrze półcieniowym trójpolowym.

* w półautomatycznym polarymetrze pole widzenia podzielone jest na 2 równe części. Należy doprowadzić do jednakowego zaciemnienia obu połówek wg załączonej instrukcji obsługi (na końcu tego opracowania).

   2.2. Przebieg ćwiczenia.

   Na pomiar kąta skręcenia płaszczyzny polaryzacji światła przez roztwór sacharozy w obecności inwertazy składają się następujące czynności:

- Przygotowanie roztworów sacharozy (w wodzie destylowanej) i inwertazy (w buforze octanowym o pH 4,5) o odpowiednich stężeniach wyjściowych, podanych przez prowadzącego, przy czym każdy zespół laboratoryjny powinien wykonać serię pomiarów przy stałym, jednym, stężeniu enzymu i przy 4-5 różnych stężeniach sacharozy.
- Zanotowanie stoperem czasu rozpoczęcia reakcji w momencie wlania pierwszej kropli roztworu enzymu do roztworu sacharozy. Mieszanie obydwu roztworów w stosunku objętościowym 1:1.
- Przelanie otrzymanego roztworu mieszaniny reakcyjnej do rurki polarymetrycznej z utworzeniem wypukłej powierzchni cieczy. Kolejno ścięcie górnego menisku szkiełkiem, tak by nie powstał pęcherz powietrza, zakręcenie nakrętki i włożenie rurki polarymetrycznej do kuwety pomiarowej polarymetru.
- Ustawienie w okularze polarymetru jednakowego zaciemnienia trzech sąsiadujących ze sobą pól, zanotowanie czasu i odczytanie wartości kąta skręcenia z cyfrowego wyświetlacza polarymetru.
- Odczytywanie kąta skręcenia w odpowiednich odstępach czasowych: na początku reakcji ok. 1 minuta, kolejno ok. 2 minuty, natomiast całkowity czas trwania reakcji- ok. 15-20 minut, czyli wykonanie ok. 10-14 odczytów kąta.

Tabela 1. Schemat tabeli dla pojedynczej reakcji.

Nr pomiaru	Stężenie wyjściowe inwertazy C_E [g/dm^3]	Stężenie wyjściowe sacharozy C_0 [g/100cm^3]	Czas [min]	kąt α_t [°]	Stężenie sacharozy w reakcji C_s [g/100cm^3]	C_0-C_s [g/100cm^3]
1						
2						
3						
...						

2.3. Obliczenia

Obliczenia i wykresy funkcji wykonać dla każdej z przeprowadzonych reakcji.

2.3.1. Wyznaczenie szybkości początkowych v_0

- Malejące w czasie reakcji stężenie sacharozy, oblicza się korzystając z proporcjonalności mierzonego kąta skręcenia do stężenia substratu tj. sacharozy według poniższego wzoru:

$$C_s = \frac{1{,}16}{l} \cdot \alpha_t + 0{,}23 \cdot C_0$$

l - długość rurki polarymetrycznej [dm] (podana przez prowadzącego)
α_t – kąt skręcenia mierzony w czasie [stopnie]
C_0 – stężenie wagowe sacharozy na początku pomiarów [g/100cm^3]

- Stężenia powstających produktów (glukozy i fruktozy) w czasie reakcji hydrolizy oblicza się :

$$C_0 - C_s$$

- Wykonać wykres C_0-C_s=$f(t)$: do naniesionych punktów pomiarowych dopasować funkcję (y= $ax^2 + bx + c$) (lub $y = ax + b$)
- Dla każdej z dopasowanych funkcji rozwiązać równanie kwadratowe wyliczając x, który należy przyjąć za czas inicjacji reakcji (t_i)
- Dla każdej z funkcji wyznaczyć pochodną y'. Jej wartość, przyjąć jako szybkość początkową reakcji v_0, wyliczając ją poprzez podstawienie za x, wyliczony t_i.
- Wyniki zestawić w tabeli dla każdej reakcji

Tabela 2. Schemat tabeli dla przeprowadzonych reakcji.

Stężenie enzymu [g/dm^3]	Stężenie sacharozy [g/100cm^3]	Dopasowana funkcja y = $ax^2 + bx + c$ i jej pochodna y'	Czas inicjacji t_i [min]	v_0 g/(100cm^3·min)

2.3.2. Wyznaczenie parametrów kinetycznych

- Wykonać wykres Michaelisa- Menten w zależności wyliczonych prędkości początkowych reakcji v_0 od stężenia wyjściowego sacharozy C_0.
- Wykonać wykres Lineweavera- Burka : $\frac{1}{v_0} = f\left(\frac{1}{C_0}\right)$
- Wyznaczyć z wykresu Lineweavera- Burka stałą Michaelisa K_m oraz V_{max} z prostej $y = ax + b$:

$$\frac{1}{V_{max}} = b \rightarrow V_{max}$$

$$-\frac{1}{K_m} = -\frac{b}{a} \rightarrow K_m$$

$$oraz\ \frac{K_m}{V_{max}} \rightarrow\ nachylenie\ prostej$$

- Obliczyć stałą katalityczną- k_{kat} przez podzielenie wyznaczonej z wykresu Lineweavera- Burka wartości prędkości maksymalnej V_{max} przez stężenie enzymu C_E :

$$k_{kat} = \frac{V_{\max}}{C_E} = k_3$$

gdzie k_3 to stała szybkości rozpadu kompleksu [ES] na produkt [P] i enzym:

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P$$

- Obliczyć wydajność katalityczną przez podzielenie obu stałych: k_{kat} oraz K_m:

$$\textit{Wydajność katalityczna = skuteczność} = \frac{k_{kat}}{K_m}$$

- Zestawić obliczone parametry kinetyczne w tabeli

Tabela 3. Schemat tabeli dla wyznaczonych parametrów kinetycznych.

Parametr kinetyczny	Jednostka parametru	Wartość parametru kinetycznego
K_m (wykres)	mol / dm^3	
V_{max}	$mol/(dm^3 \cdot \min)$	
$V_{max}/2$	$mol/(dm^3 \cdot \min)$	
K_m/V_{max}	$\min$	
k_{kat}	$1/\min$	
Wydajność katalityczna	$dm^3/(mol \cdot \min)$	

3. Uwagi do wykonania ćwiczenia

- Ze względu na dużą wrażliwość enzymu na zanieczyszczenie mikroorganizmami, szkło i sprzęt powinno być myte wodą z detergentem, płukane wodą destylowaną i acetonem oraz suszone w suszarce w temp 110°C. Roztwory inwertazy, sacharozy i buforowe powinny być przechowywane były w szczelnie zamkniętych kolbach w chłodni.
- Roztwory enzymu sporządzać w buforze octanowym o pH= 4,5[1].
- Minimalna objętość roztworu do rurki polarymetrycznej wynosi 12 cm^3- na taką objętość przeliczać stosunki objętościowe roztworów inwertazy i sacharozy o odpowiednich stężeniach.
- Po każdym użyciu rurki polarymetrycznej dokładnie ją myć i suszyć.

[1] Przepis na bufor octanowy o pH= 4,5 wg Walpole'a z *Poradnika Fizykochemicznego*, wyd. II, WNT, Warszawa 1974 .

- Stężenia roztworów enzymu i sacharozy w rurce polarymetrycznej są dwukrotnie mniejsze, po zmieszaniu w stosunku objętościowym 1:1. Do obliczeń i wykresów należy użyć stężeń po zmieszaniu.
- Do obliczeń parametrów kinetycznych i sporządzania wykresów stężenia masowe roztworów inwertazy i sacharozy przeliczyć na stężenia molowe. Masa molowa inwertazy wynosi 100 000g/mol a sacharozy 342,3 g/mol.

4. Zagadnienia obowiązujące do zrealizowania ćwiczenia.

Kinetyka chemiczna: szybkość i stała szybkości reakcji, krzywa kinetyczna reakcji 0 i I rzędu, rząd reakcji, szybkość początkowa reakcji, wyznaczanie szybkości początkowej v_0, wpływ stężeń substratów i innych czynników na szybkość reakcji 0,I,II rzędu, równowaga rekcji, stała równowagi, prawo równowagi chemicznej, energia aktywacji, katalizator, kataliza mikroheterogeniczna.

Kinetyka enzymatyczna: enzymy- budowa i właściwości, modele opisujące działanie enzymów, model Michaelisa- Menten, mechanizm reakcji enzymatycznej, kompleks ES, równanie i wykres Michaelisa- Menten, równanie i wykres Lineweavera- Burka, wpływ stężenia początkowego substratu i enzymu na v_0, stała K_m, k_{kat}, szybkość maksymalna V_{max}, jednostki aktywności enzymatycznej, termodynamika reakcji enzymatycznej, hydroliza sacharozy w obecności inwertazy.

Polarymetria: Substancje optycznie czynne- budowa i właściwości, zasada działania polarymetru i budowa.

5. Literatura

1. Stryer L., *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003. Enzymy: podstawowe pojęcia, s. 190-217.

2. Zgirski A., Gondko R., *Obliczenia biochemiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2010. Kinetyka reakcji enzymatycznych, s. 289-370.

3. Książka z chemii analitycznej, fizycznej i organicznej.

Sporządzanie roztworów i organizacja pracy

1. Każdy zespół powinien sporządzić 50cm^3 świeżego roztworu sacharozy o wyjściowym stężeniu ok. 16 %:

- Odważyć w naczynku wagowym dokładnie 8 g sacharozy
- Przenieść ilościowo przez lejek do kolby miarowej 50 cm^3, rozpuścić w wodzie destylowanej i dopełnić do kreski.
- Gotowy roztwór przelać do kolbki stożkowej z korkiem, w celu ułatwienia pobierania roztworu pipetą.

2. Zespoły 4-osobowe będą wykonywały pracę w zespołach 2-osobowych. Każdy podzespół przygotowuje z wyjściowego roztworu sacharozy, przez rozcieńczenie, 2-3 roztwory sacharozy o niższych stężeniach podanych przez prowadzącego (p. tabela 1) i przy jednym stałym stężeniu inwertazy podanym przez prowadzącego (tj. 0,08g/l lub 0,06 g/l, lub 0,04g/l).

3. Roztwór inwertazy w buforze octanowym o danym stężeniu będzie przygotowany i przechowywany w chłodni.

4. Stężenia sacharozy i enzymu po zmieszaniu w stosunku objętościowym 1:1 będą dwukrotnie mniejsze i należy je przeliczyć na stężenia molowe i używać do obliczeń i sporządzania wykresów.

5. Każdy podzespół powinien mieć przygotowane czyste, wysuszone kolbki stożkowe, podpisane danym stężeniem roztworu enzymu i sacharozy oraz pipety oddzielnie do pobierania roztworu enzymu, sacharozy i wody destylowanej.

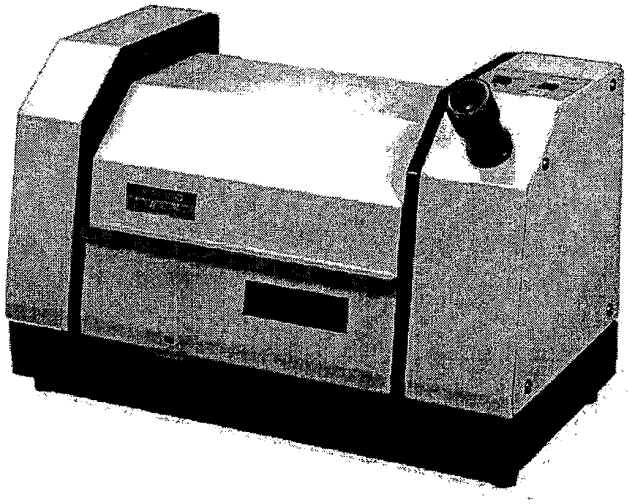
6. Każdy podzespół przeprowadza reakcje inwersji sacharozy zarówno przy wysokim jak i przy niskim stężeniu sacharozy posługując się zarówno polarymetrem Zeissa jak i polarymetrem POLAX-2 ATAGO.

Tabela 1. Tabela objętości i stężeń roztworów.

Nr roztworu	V r-ru sacharozy 20% [cm^3]	V wody dest. [cm^3]	Stężenie otrzymanego r-ru sacharozy [%]	V r-ru inwertazy o podanym stężeniu [cm^3]	Stężenie r-ru sacharozy w mieszaninie reakcyjnej [%]
1.	5	0	16	5	8
2.	~~4,5~~	~~1,5~~	15	6	7,5
3.	4,5	1,5	12	6	6
4.	2,5	2,5	10	8	5
5.	2,5	2,5	8	5	4
6.	~~1,5~~ 3	3,5	6	8	3
7.			4		2

Polarymetr Polax-2L

272-47-5223



Instrukcja obsługi

Instrukcja obsługi

POLARYMETR POLAX-2L

1. Opis aparatu (p. punkt 4).

2. Podłączyć kabel zasilania do gniazda zasilającego.

3. Włączyć aparat przyciskiem znajdującym się w tylnej części aparatu, obok gniazda kabla zasilającego.

5. Napełnić rurkę polarymetryczną wodą destylowaną, umieścić ją w komorze polarymetru i przystąpić do kalibracji aparatu.

6. Zresetować wyświetlane wartości (do 0) za pomocą przycisku ZERO SET(pod warunkiem, gdy świeci się zielona lampka- sygnalizator gotowości aparatu do zerowania). Jeżeli lampka nie świeci się należy postępować wg. oryginalnej instrukcji obsługi (p. punkt 7-Kalibracja).

7. Jeżeli wyświetlacz aparatu chwilowo wyłączy się- należy przycisnąć Shift/Temp.

8. W celu odczytania temperatury należy przetrzymać dłużej przycisk Shift/Temp.

9. Właściwy sposób pomiaru kąta skręcenia i ustawienia pól- wg. oryginalnej instrukcji obsługi (p. punkt 7-Sposób pomiaru).

1. Uwagi wstępne

Dziękując Państwu za wybór naszej firmy jako dostawcy sprzętu laboratoryjnego, prosimy jednocześnie o poszanowanie pracy, którą codziennie wkładamy w opracowywania profesjonalnych instrukcji obsługi i o nieudostępnianie naszych opracowań stronom trzecim bez naszej zgody.

Niniejsza instrukcja jest wyłączną własnością firmy Conbest i nie może być powielana ani przekazywana osobom trzecim bez pisemnej zgody firmy Conbest Sp. z o.o.
Jej wykorzystywanie ze sprzętem innym niż zakupionym w firmie Conbest stanowi naruszenie praw własności.

Jesteśmy pewni, że dostarczone urządzenie będzie obsługiwane przez odpowiednio wykwalifikowany personel, niemniej przypominany, że niniejsza instrukcja nie zastępuje przepisów BHP. Do obowiązków użytkownika należy zapoznanie się z odpowiednimi przepisami Bezpieczeństwa i Higieny Pracy i stosowanie się do nich w czasie użytkowania opisywanego urządzenia. Przy pracy z substancjami niebezpiecznymi lub agresywnymi należy bezwzględnie stosować sprzęt ochronny. Należy też mieć pewność, że substancje mające styczność z urządzeniem nie spowodują jego uszkodzenia.

2. Parametry

Zakres pomiarów	Kąt skręcania: +180° do – 179.95° Skala cukrowa : 130 do -130°Z
Minimalne wskazania	Kat skręcania: 0.05° Skala cukrowa : 0.1°Z
Źródło światła	LED z filtrem interferencyjnym 589nm
Warunki pracy	Temp +5°C do +40°C Wilgotność względna do 80% przy temp do 31°C Wilgotność do 50% przy temp. do 40°C Dopuszczalny stopień zanieczyszczenia powietrza 2 (zgodnie z IDC60664)
Zasilanie	100 do 240V (50/60Hz) zmiany napięcia nie mogą przekraczać 10% Dopuszczalne chwilowe przekroczenia napięcia kategoria II.
Moc	40 VA
Wymiary	43 x 22 x 30 cm
Ciężar	11.5 kg

3. Rozpakowanie i uruchomienie

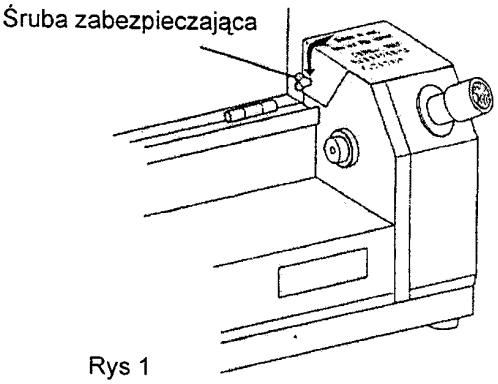
3.1 Rozpakowanie

- Wyjmij aparat z opakowania i sprawdź, czy w czasie transportu nie powstały zewnętrzne uszkodzenia.
- W dostarczonej paczce znajdują się:

aparat Polax 2L	1 szt.
kabel zasilający	1 szt.
rurka obserwacyjna 100 mm	1 szt.
rurka obserwacyjna 200 mm	1 szt.
zapasowy bezpiecznik	1 szt.
instrukcja obsługi	1 szt

Uwaga:

Polax 2-L posiada „ tzw śrubą zabezpieczającą na czas transportu wewnętrzne mechanizmy aparatu. Przed uruchomieniem śrubę tą należy wykręcić. Należy zachować tą śrubę i zabezpieczać aparat za każdym razem, gdy będzie transportowany.



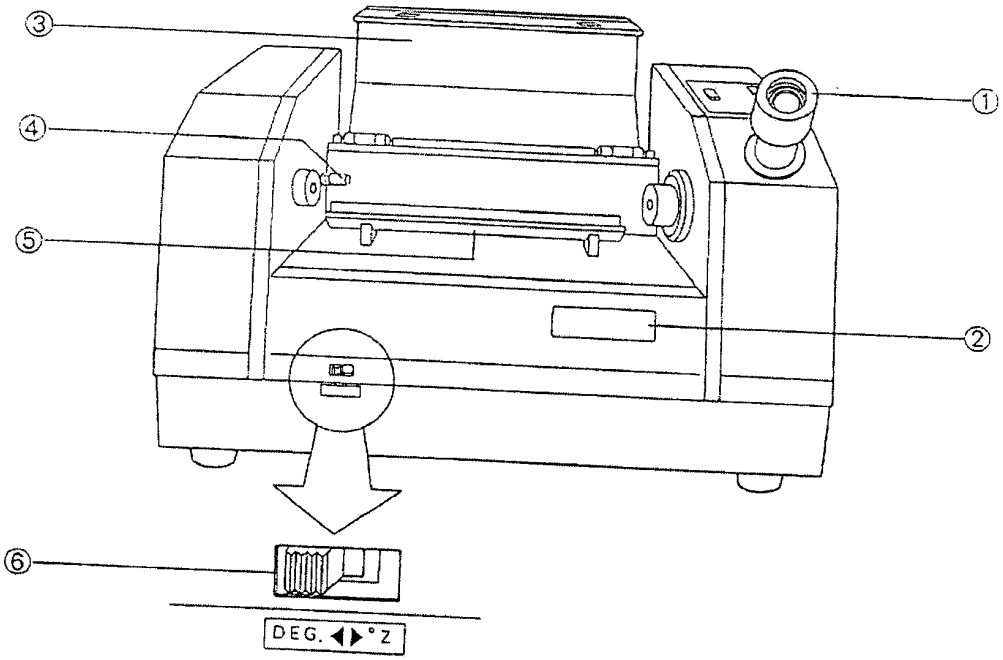
Rys 1

3.2 Uruchomienie

1. Należy ustawić aparat na równej powierzchni, nienarażonej na wibrację, np. stabilnym stole laboratoryjnym. W czasie pracy ważne jest unikanie wstrząsów stołu, które mogłyby przenieść się na aparat.
2. Temperatura pracy aparatu nie powinna przekraczać +5°C do +40°C.
3. Wybrane miejsce pracy musi być wolne od kurzu, wibracji, z dala od źródeł ciepła i korozyjnych gazów. Powinno być również oddalone od okien i wpływu oświetlenia promieniami słonecznymi.
4. Przy pomocy dostarczonego kabla zasilającego należy podłączyć Polax 2L do sieci 240V 50/60 Hz (odchyłki napięcia nie powinny przekraczać 10% podanych wartości)

4. Opis aparatu

4.1 Część przednia



Rys. 2

1. Okular
   Służy do porównania jasności półprzeźroczystych półkolistych pól. W przypadku, gdy pola nie są wyraźnie widoczne – ostrość obrazu poprawiamy górnym pierścieniem okularu.

2. Wyświetlacz
   Na wyświetlaczu widoczne są mierzone wartości: w jednostkach kąta skręcania lub wartości podane w skali cukrowej wg (ICUMSA)

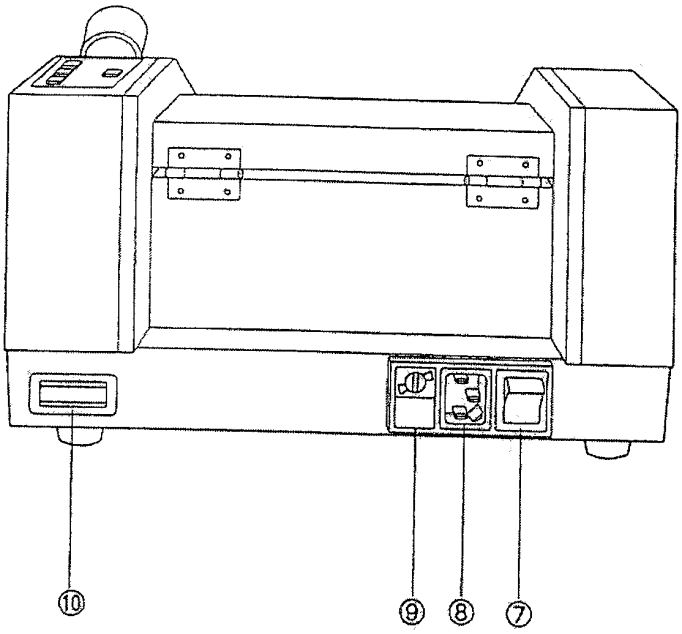
3. Pokrywa komory
   Zabezpiecza przed zewnętrznym światłem w czasie pomiaru. Zewnętrzne światło wpływa na wartość mierzoną, dlatego przed „zerowaniem" lub pomiarem pokrywa musi być zamknięta.

4. Czujnik temperatury
   Mierzy temperaturę w czasie wykonywania pomiaru kąta skręcania próbki.

5. Gniazdo rurki obserwacyjnej
   Rurkę obserwacyjną umieszczamy w gnieździe przed „zerowaniem" lub pomiarem

6. Przełącznik skal
   Służy do przełączania pomiędzy skalami „kąt skręcania" lub „skala cukrowa (wg ICUMSA). Wskazuje, w jakiej skali wyświetlany jest wynik.

4.2 Część tylna



Rys. 3

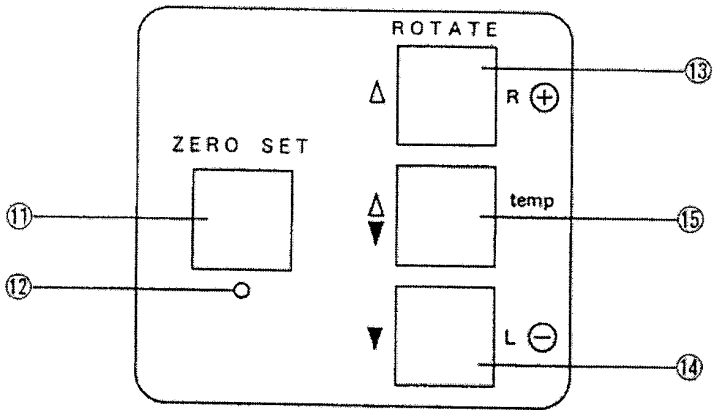
7. Włącznik
   Służy do włączania/ wyłączania aparatu

8. Gniazdo kabla zasilającego

9. Gniazdo bezpieczników

10. Etykieta znamionowa z numerem serii.
    Konieczna do identyfikacji urządzenia w celach gwarancyjnych.

5. Panel sterowania



Rys. 4

11. Przycisk zerowania
    Służy do zresetowania wyświetlanych wartości (do 0).
    Przycisk ten używamy TYLKO podczas zerowania (nie wolno go przyciskać podczas pomiarów)!

12. Lampka-sygnalizator gotowości aparatu do zerowania
    Gdy lampka się świeci to oznacza, że można przystąpić do „zerowania" aparatu.

13. Przycisk "Obrót w prawo"
    Przyciskając ten przycisk półkola obserwacyjne powoli obracane są w prawo a wartość pokazywana na wyświetlaczu wzrasta.

14. Przyciski „ Obrót w lewo"
    Przyciskając ten przycisk półkola obserwacyjne powoli obracane są w lewo a wartość pokazywana na wyświetlaczu maleje.

15. Przełącznik „Shift/Temp"
    Gdy przycisk ten jest wciśnięty wraz z jednym z włączników w prawo lub lewo, powoduje szybszy obrót rurki obserwacyjnej (tryb szybkich obrotów).
    Gdy przycisk przytrzymamy przez 2 sek. lub dłużej, na wyświetlaczu będzie pokazana aktualna temperatura pomiaru. Po uwolnieniu przycisku na wyświetlaczu ponownie wyświetlana jest wartość w skali cukrowej lub kąt skręcania.

6. Przygotowanie do pomiarów

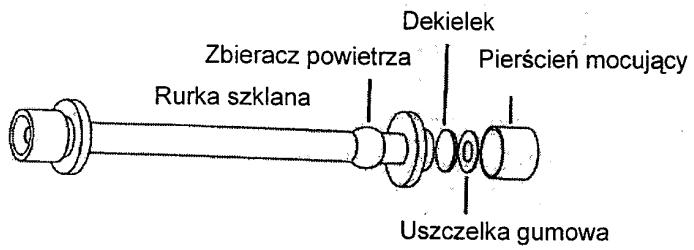
6.1 Podłączenie

- Podłączyć kabel sieciowy do aparatu.
- Włączyć kabel sieciowy do gniazda 240V.
- Załączyć aparat przełącznikiem „On/Off" ; na wyświetlaczu powinno pojawić się „0.00". Aparat jest ustawiony fabrycznie odczyt na wartości w stopniach kąta skręcania.
  Wartość „0.0" pojawia się, gdy wybrano skalę cukrową.

6.2 Rurki obserwacyjne

Uwaga:

- *Z rurkami należy obchodzić się bardzo ostrożnie – są wykonane ze szkła.*
- *Rurki szklane, dekielki, uszczelki gumowe i pierścienie mocujące można zamówić jako cześci zapasowe.*



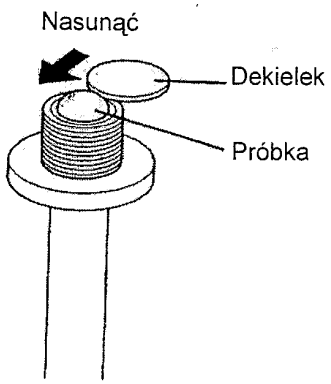
Rys. 5 Rurka obserwacyjna

Z aparatem dostarczane są 2 rurki 100 mm i 200 mm.
Do obserwacji próbek przeźroczystych zwykle używa się rurki 200 mm, natomiast do próbek zabarwionych i zmętniałych zaleca się stosowanie rurki 100 mm. Zabarwienie lub zmętnienie wpływa na dokładność pomiaru, dlatego próbkę przed pomiarem należy przefiltrować.

Rurka obserwacyjna składa się z rurki szklanej, 2 dekielków, 2 uszczelek gumowych i pierścieni mocujących. Dekielki, uszczelki oraz pierścienie mocujące pasują zarówno do rurki 100 mm jak i 200 mm.

6.3 Przygotowanie próbki

- Odkręcić pierścień mocujący z jednego końca rurki oraz ściągnąć dekielek i uszczelkę.
- Trzymając rurkę pionowo ostrożnie wlać próbkę do rurki do jej całkowitego wypełnienia aż pojawi się menisk (wynikający z napięcia powierzchniowego cieczy). Następnie delikatnie ściąć menisk dekielkiem przesuwając go tak by nie pozostała w rurce bańka powietrza.
- Założyć podkładki gumowe i zakręcić pierścieniem mocującym.



Uwaga:
Jeżeli pojawiły się banieczki powierza należy je zgromadzić w zbieraczu powietrza.
Jeżeli baniek powietrza jest zbyt dużo, będą one wpływać na pomiar i wynik na wyświetlaczu będzie ciągle się zmieniał (nie ustabilizuje się).

Rys. 6. Nałożenie próbki

7. Kalibracja – Zerowanie

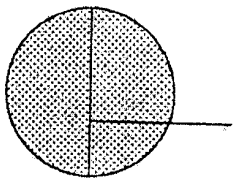
Uwaga:

- *Należy uważać, aby nie rozlać wody lub próbki na aparat*
- *Aparat posiada funkcję autowyłączenia gdy nie jest używany przez dłużej niż 5 minut. Aby powrócić do trybu pracy należy nacisnąć przycisk „ Shift/Temp". Na wyświetlaczu pojawią się znowu wartości ostatnio mierzonych próbek.*

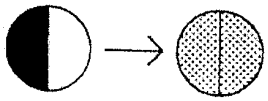
- Włącz aparat włącznikiem „On/Off" (o ile był wyłączony).
- Napełnij rurkę obserwacyjną wodą destylowaną i wmieść ją w gnieździe. Upewnij się że, lampka sygnalizująca gotowości do „Zerowania" świeci się.
- Jeżeli lampka nie świeci się oznacza to, że punkt zerowy jest przesunięty o kąt większy niż 6 stopni. W tym przypadku należy nacisnąć równocześnie klawisze „Shift/Temp" oraz przycisk obrotów w prawo lub przycisk obrotów w lewo, aż lampka zaświeci się.

Uwaga:

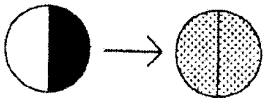
Kiedy lampka – sygnalizator świeci się, wskazuje to iż możliwe jest przeprowadzenie procedury zerowania. Oglądana w okularze linia graniczna pomiędzy półkolami powinna być pionowa.
Jeżeli linia graniczna obserwowana w okularze jest pionowa a mimo to lampka nie świeci się oznacza to, że pole obserwacji obrócone jest o 180°. W tym wypadku należy przycisnąć równocześnie i przytrzymać przyciski "Shift/Temp" oraz „Obrót w prawo" lub „ Obrót w lewo" aż do chwili, gdy lampka się zaświeci.



- Po upewnieniu się, że lampka się świeci, należy wyrównać jasność obu półkul obserwując je poprzez okular, równocześnie naciskając przycisk „obrót w prawo" lub „obrót w lewo".



Kiedy prawa półkula jest jaśniejsza to przyciskamy „obrót w prawo" aż do wyrównania jasności półkul.



Kiedy lewa półkula jest jaśniejsza to przyciskamy „obrót w lewo" aż do wyrównania jasności półkul

- Po wyrównaniu jasności półkul nacisnąć przycisk" ZERO SET"
- Należy upewnić się, że wyświetlacz pokazuje wartość 0.00 (lub 0.0. gdy wybrano skalę cukrową)

Po tych czynnościach aparat jest wykalibrowany (tzn. ma ustawioną wartość kąta skręcania na zero dla wody destylowanej).

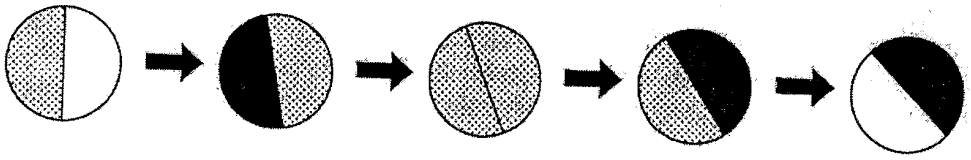
7. Sposób pomiaru

Uwaga:

- *Za każdym razem po włączeniu aparatu na wyświetlaczy pojawią się cyfry 0.00 lub 0.0. Pomimo to zalecane jest przeprowadzenie kalibracji za każdym razem, gdy włączamy aparat i rozpoczynamy pracę.*
- *Aparat posiada funkcję autowyłączenia gdy nie jest używany przez dłużej niż 5 minut. Aby powrócić do trybu pracy należy nacisnąć przycisk „ Shift/Temp". Na wyświetlaczu pojawią się znowu wartości ostatnio mierzonych próbek.*
- *Przed pomiarem należy sprawdzić, w jakim trybie ustawiony jest przełącznik skali. Przełącznik w lewej pozycji ustawiony jest na skalę w stopniach skręcania „DEG" a w pozycji lewej w stopniach skali cukrowej „Z". Na czas transportu przełącznik ustawiony na kąt skręcania „DEG".*

Pomiar:

- Napełnić rurkę pomiarową badaną próbką i umieść ją w centrum gniazda pomiarowego.
- Obserwować półkola poprzez okular. Ich jasność może być różna
    - Kiedy prawe półkole jest jaśniejsze, naciskamy przycisk „obrót w prawo" obserwując ciągłą zmianę jasności obu półkul jak to pokazano na rysunku.

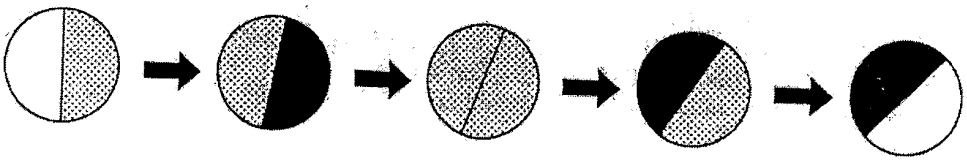


Na wyświetlaczu jest wartość 0°

Odczytaj wartość z wyświetlacza

Mimo że prawe półkole było jaśniejsze na początku to teraz stało się ciemniejsze a w fazie środkowej jasność obu półkul była jednakowa. Przy takim właśnie obrocie rurki możemy odczytać wartość skręcania dla naszej próbki.

- Kiedy lewe półkole jest jaśniejsze naciskamy przycisk „obrót w lewo" obserwując ciągłą zmianę jasności obu półkul jak to pokazano na rysunku.



Na wyświetlaczu jest wartość 0°

Odczytaj wartość z wyświetlacza

Mimo że lewe półkole było jaśniejsze na początku to teraz stało się ciemniejsze a w fazie środkowej jasność obu półkul była jednakowa. Przy takim właśnie obrocie rurki możemy odczytać wartość skręcania dla naszej próbki.

8. Metody wyrównania jasności półkul

Naciśnij przyciski „Shift/Temp" i „Obrót w prawo" lub „Obrót w lewo" (szybkie obroty) aż do chwili gdy jasność półkul jest w przybliżeniu taka sama. Następnie przyciskając tylko przyciski "Obrót w prawo" lub „Obrót w lewo" (wolne obroty) doprowadzamy do precyzyjnego wyrównania jasności a następnie odczytujemy wartość z wyświetlacza.

Zaleca się, aby procedurę pomiaru powtarzać 3 do 5 razy i wyciągać średnią z pomierzonych wartości.

Naciskając „Obrót w prawo" powodujemy przyciemnianie prawego półkola a naciskając „Obrót w lewo" powodujemy przyciemnianie lewego półkola.

Jeżeli jest niewielka różnica w jasności pomiędzy półkolami to wtedy przyciskamy tylko „Obrót w prawo" i na zmianę „Obrót w lewo" aż do wyrównania jasności półkul.

W przypadku, gdy trudno jest uzyskać równą jasność obu półkul, może być to spowodowane zbyt dużym wstępnym obrotem próbki. Należy przycisnąć „Shift/Temp" i „Obrót w prawo" lub „Obrót w lewo" aż na wyświetlaczu ukażą się wartości 0.00 lub 0.0, po czym jeszcze raz rozpocząć pomiar.

Na koniec dnia pracy należy wartości na wyświetlaczu ustawić na „0". W tym celu należy nacisnąć przycisk „Shift/Temp" i „Obrót w prawo" lub „Obrót w lewo" aż do uzyskania wartości „0.00" lub „0.0".
Ułatwia to rozpoczęcie procedury kalibracji przy kolejnym włączeniu aparatu.

9. Odczyt temperatury

By odczytać temperaturę w gnieździe pomiarowym, przytrzymujemy przez 2 sek. przycisk "Shift/Temp".
Po jego uwolnieniu wyświetlacz powraca do normalnego trybu pracy.

27.5 c

10. Uwagi dotyczące pomiarów

- Jeżeli koncentracja próbki jest zbyt duża, niejednorodna lub zbyt mało przeźroczysta, może to prowadzić do błędnych wyników. Zalecane jest w takich przypadkach pozostawienie próbki w gnieździe pomiarowym na kilka minut aż warunki pomiaru ustabilizują się.

- Jeżeli próbka nie jest przeźroczysta należy ją przefiltrować jak najdokładniej jak to możliwe. Jeżeli dalej jest trudno jest dokonać pomiar, istnieje podejrzenie, że dla danej próbki rurka pomiarowa jest zbyt długa czyli dystans penetracji promienia przez próbkę jest zbyt duży.

- Jeżeli objętość próbki jest mała, należy użyć specjalnych rurek (opcja) o pojemności 1,0 lub 1.5ml. Zakupu tych opcjonalnych rurek oraz zestawów do filtracji można dokonać u dealera Agato w Polsce firmy Conbest.

- Mutarotacja
  Zanim glukoza-D zostanie rozpuszczona w wodzie występuje ona w formie alfa-cząsteczek. Po rozpuszczeniu w wodzie alfa-cząsteczki ciągle zmieniają się w beta-cząsteczki.
  Cząsteczki typu alfa i beta różnią się do siebie a zatem wykonując pomiar, w gdy w roztworze nie całkowicie rozpuszczone są cząsteczek glukozy-D wynik pomiaru może ulegać zmianie w czasie. Poprawną wartość uzyskamy, gdy wszystkie cząsteczki alfa zmienią się w cząsteczki beta. Takie zjawisko nazywamy mutarotacją. Zwracamy uwagę na występowanie tego zjawiska przy wykonywaniu pomiarów w Państwa próbkach.

11. Co oznaczają mierzone wartości

- Jeżeli poznamy wartość kąta skręcania próbki to możemy obliczyć koncentrację aktywnych cząstek w tej próbce wg wzoru:

$$C = \frac{100a}{l \times (aw)^{t}_{D}}$$

C – koncentracja aktywnych cząstek w próbce (g/100ml)
a – mierzona wartość (kąt skręcania)
l – dł. rurki obserwacyjnej x 1dm = 100mm
aw – względny optyczny kąt skręcania
t – temperatura C
D – symbol wskazujący że pomiar wykonano przy użyciu światła o długości fali 589nm (tak jest w przypadku Polax-2L)

Przykład:
Przy pomiarze wodnego roztworu próbki L-sodium Ascorbate w rurce 100mm (1dm) odczytano wynik 3.25 °
Względny optyczny kąt skręcania dla L-sodium Ascorbate wynosi 116°
A zatem

$$C = \frac{100a}{l \times (aw)^{t}_{D}} = \frac{100 \times 3.25}{1 \times 116} = 2.80$$

Z równania wynika, że koncentracja w próbce L-sodium Ascorbate wynosiła 2.80 g/100ml.

- Względny kąt skręcania $(aw)^t_D$ substancji optycznie czynnych można obliczyć poprzez dokładnie zważenie a następnie rozpuszczenie w optycznie nie aktywnej cieczy. Zaleca się, aby zaznaczać w jakiej cieczy substancja jest rozpuszczona, gdyż względny kąt skręcania zależy od rodzaju rozpuszczalnika.

$$(aw)^t_D = \frac{100a}{l \times C}$$

- W przypadku czystych cieczy

$$(aw)^t_D = \frac{100a}{l \times d}$$

d= gęstość

Jeżeli znamy względny kąt skręcania dla próbki, zgodnie z powyższym równaniem wygodnie jest także określić czystość próbki.

12. Sprawdzenie i wymiana bezpiecznika.

Uwaga:
Przed wymianą bezpiecznika wyłączyć kabel zasilający z sieci.

- Odkręcić gniazdo bezpiecznika i wyjąć bezpiecznik.
- Sprawdzić czy bezpiecznik został przepalony. Jeżeli optyczna ocena nie jest miarodajna należy sprawdzić oporność używając omomierza. Jeżeli opór wynosi ok. 0Ω oznacza to, że bezpiecznik jest dobry.
- Jeżeli bezpiecznik jest przepalony, wymieniamy go na nowy, typ- F 1A, 250V nr katalogowy RE5784;
- Po włożeniu bezpiecznika do gniazda całość montujemy w odwrotnej kolejności.