

Praktische opdracht biologie: pH-optimum van pepsine

Namen:

Klas:

Datum:

Dit practicum is gemaakt door Wageningen Pre-University in opdracht van Wageningen University & Research.

Inleiding

Pepsine is een enzym, actief in de maag, dat wordt gebruikt om eiwitten te splitsen van grote componenten tot polypeptiden. Samen met zoutzuur is pepsine de hoofdcomponent van humaan maagzuur, evenals het geval is bij veel diersoorten; het was dan ook het eerst ontdekte dierlijke enzym.

Pepsinogeen wordt gemaakt in de cellen van de maagwand, samen met zoutzuur en andere componenten. In een zure omgeving wordt dit pro-enzym omgezet in pepsine.

Naast pepsine zijn er andere proteases in de maag, namelijk trypsine en chymotrypsine; elk is gespecialiseerd in het breken van bepaalde bindingen. Pepsine breekt het best bindingen tussen hydrofobe en aromatische aminozuren, namelijk phenylalanine, tryptofaan en tyrosine.

In dit experiment wordt het pH-optimum van pepsine bepaald met behulp van pepsine afkomstig uit varkensmaag. Als substraat wordt het bloed-eiwit hemoglobine gebruikt. Wij hebben vijf 2% hemoglobine-bufferoplossingen voor jullie klaargezet met een pH van respectievelijk 1, 2, 3, 4 of 5. Het endopeptidase pepsine maakt onder andere tyrosine vrij uit hemoglobine. Tyrosine kleurt blauw onder invloed van het Folin-Ciocalteusreagens. De hoeveelheid geproduceerd tyrosine kan vervolgens bij een golflengte van 660 nm in een spectrofotometer worden bepaald.

Benodigheden

- 12 mL elk van vijf 2% hemoglobine-bufferoplossingen met respectievelijk pH 1, 2, 3, 4 en 5
- 15 mL pepsine-oplossing met een concentratie van 1 mg/mL
- 1,5 mL Folin-Ciocalteusreagens
- demiwater
- 150 mL 0,3 M trichloorazijnzuur (TCA) in een fles met een 10 mL dispenseerpomp
- 30 mL 0,5 M natronloog (NaOH)
- 12 plastic centrifugebuizen van 50 mL in een rek
- 12 glazen reageerbuizen van 40 mL in een rek
- plastic pasteurpipetten van 1 en 3 mL met schaalverdeling
- een micropipet van 5000 μ L ('**p5000**') en van 100 μ L ('**p100**')

- een vortex;
- een stopwatch;
- een waterbad op 25 °C;
- reageerbuisshouders voor in het waterbad;
- een centrifuge waar 50 mL buizen in passen;
- een spectrofotometer ingesteld op een golflengte van 660 nm;
- 13 wegwerpcuvetten;
- een fineliner / dunne stift;
- twee vellen grafiekpapier;
- schrijfgerei: potlood, pen, rekenmachine, geodriehoek;

Protocol

A. Incubatie

A1. Merk 10 plastic 50 mL centrifugebuizen *1a, 1b, 2a, 2b 5a, 5b* (vijf monsters, elk in duplo) en nog eens 2 buizen waarvan één gemerkt als *blanco 2* en één als *blanco 5*. Je hebt in het totaal nu dus 12 buizen!

A2. Pipetteer met de p5000 in duplo 5 mL 2% hemoglobine-oplossing met de verschillende pH-waarden in de centrifugebuizen: pH =1 in buizen 1a en 1b, pH = 2 in buizen 2a en 2b, etc.

A3. Pipetteer met een plastic pasteurpipet 1 mL pepsine-oplossing in de eerste buis (1a) en druk tegelijkertijd de stopwatch in. Meng daarna goed op de vortex, en plaats de buis in het waterbad van 25 °C.

A4. Voeg na 30 seconden 1 mL pepsine-oplossing toe aan de volgende buis (buis 1b) en meng vervolgens op de vortex, en plaats de buis in het waterbad. Werk via dit 30-seconden-schema alle buizen af, behalve de blanco's [zie A5].

A5. Blanco's: pipetteer met de p5000 5 mL pH=2-oplossing in de buis gelabeld *blanco 2*, (dit is de blanco voor pH 1, 2, en, 3) en pH=5-oplossing in de buis gelabeld *blanco 5* (de blanco voor pH 4 en 5). Voeg 1 mL pepsine-oplossing toe en onmiddellijk daarna 10 mL 0,3 M TCA met de dispenseerpomp boven op de fles met TCA. Meng goed.

A6. Stop na 20 min. de incubatie in de andere buizen door met de dispenseerpomp 10 mL 0,3 M TCA toe te voegen en de inhoud van de buizen goed te mengen. Doe dit weer in intervallen van 30 s (in dezelfde volgorde als de toevoeging van de pepsine-oplossing).

A7. Geef de centrifugebuizen aan een van de begeleiders. De buizen worden gedurende 10 min. gecentrifugeerd bij ca. 1500×g (1500 maal de zwaartekrachtsversnelling; de assistenten weten hoeveel rpm dat is bij de centrifuge die je gebruikt).

B. Extinctiemetingen

B1. Markeer 12 glazen reageerbuizen van 40 mL weer voor de vijf monsters in duplo en de twee blanco's.

B2. Pipetteer na het centrifugeren 1 mL (met een plastic pasteurpipet) van het supernatant (bovenstaande vloeistof) uit de 50-mL centrifugebuizen in de overeenkomstige reageerbuis.

B3. Voeg 2 mL 0.5 M NaOH en 6 mL H₂O toe en meng goed.

B4. Voeg 100 µL Folin-Ciocalteusreagens toe aan alle buizen, dit keer met een interval van 1 min. Meng goed.

B5. Laat elke buis 4 minuten incuberen, meng de inhoud nog een keer goed en pipetteer dan uit elke buis genoeg vloeistof in een wegwerpcuvet om de cuvet voor ca. driekwart te vullen. Meet de extinctie van elk monster bij 660 nm. De metingen worden dus met een interval van 1 min. en in dezelfde volgorde als de toevoeging van het reagens uitgevoerd.

Schrijf je meetresultaten op in de tabel op het antwoordblad.

Antwoordblad

Opgave 1 Zet je meetresultaten in de onderstaande tabel:

pH	Extinctie bij 660 nm		Gemiddelde extinctie na blanco correctie
1			
2			
3			
4			
5			
Blanco pH 2			
Blanco pH 5			

Opgave 2 Geef de resultaten van de extinctiemetingen weer in een grafiek op het grafiekpapier. Schrijf je namen hier ook op! (4p)

Opgave 3 Wat is het pH-optimum van pepsine? Verklaar je antwoord. (2p)

Opgave 4 Wat is de functie van TCA in deze proef? En wat is de functie van NaOH in deze proef? (2p)

Opgave 5 We zouden deze proef graag verfijnen en optimaliseren, zodat we nauwkeurigere en betrouwbaardere resultaten krijgen en meerdere monsters tegelijk kunnen meten. Beschrijf twee aanpassingen die je zou doen en waarom. (2p)

Opgave 6 Welke andere variabele heeft, naast pH, invloed op de werking en efficiëntie van enzymen? Waarom is dat in dit geval niet (heel) relevant? Bij welke dieren kan dit wel een probleem worden? (3p)

In ons lichaam worden eiwitten voor vanalles gebruikt en hergebruikt. Door eiwitten af te breken en weer op te bouwen wanneer ze nodig zijn hoeven we dagelijks slechts een klein deel (20%) van onze eiwitbehoefte via voeding binnen te krijgen. Dit wordt de *eiwitturnover* genoemd. Amino-zuren kunnen niet worden opgeslagen, de overtollige amino-zuren worden verbrand voor energie.

Opgave 7 Noem twee functies van eiwitten in ons lichaam. (2p)

De eiwitten van het lichaam worden alleen afgebroken voor energie wanneer alle andere reserves (glycogeen, vetten) verbruikt zijn, zoals in een hongersnood of bij mensen die lijden aan anorexia nervosa.

Opgave 8 Noem twee redenen waarom het lichaam eerder glucose dan eiwitten zal verbranden. (2p)

Klaar met dit practicum?

Ga naar exactwatjezoekt.nl voor hulp bij de exacte vakken. Ook vind je informatie over studies en beroepen in de bèta en techniek.



Oefenen met biologie?

Ga naar <https://exactwatjezoekt.nl/hulp-bij-leren/>



Doe de studiekeuze test en check welke studies het beste bij jou passen op

<https://exactwatjezoekt.nl/studiekeuze/>



Wil je iets met bèta of techniek?

Maak kennis met de beroepen op

<https://exactwatjezoekt.nl/overzicht-beroepen/>

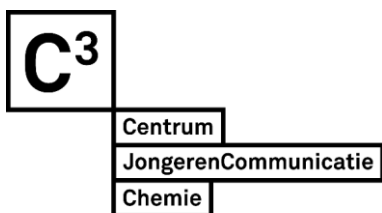
Colofon

Dit practicum is gemaakt voor de voorronde van de EOES in 2022-2023 door



Wageningen University & Research is intellectueel eigenaar van de inhoud van dit practicum.

Dit practicum is een uitgave van



Ontdek, ervaar, kies

Dit practicum en alle bijbehorende materialen zijn onderhevig aan de C3 disclaimer zoals vermeld op c3.nl/disclaimer. Uiteraard is door Centrum JongerenCommunicatie Chemie veel zorg aan deze handleiding besteed. Centrum JongerenCommunicatie Chemie aanvaardt echter geen aansprakelijkheid voor schade die eventueel is ontstaan bij het geven van het practicum 'pH-optimum van pepsine'.

© Centrum JongerenCommunicatie Chemie, december 2025